

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. September 2004 (30.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/083407 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 1/00,
15/52, 15/81, 9/02, C12P 33/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/002582

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. März 2004 (12.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 12 314.8 19. März 2003 (19.03.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÜNKEL, Andreas
[DE/DE]; Julius-Wilde-Str. 3, 67434 Neustadt (DE).
VEEN, Markus [DE/DE]; Becherweg 30, 13407 Berlin
(DE). LANG, Christine [DE/DE]; Gustav-Meyer-Allee
25, 13355 Berlin (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

54379

020312

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ERGOSTA-5,7-DIENOL AND/OR BIOSYNTHETIC INTERMEDIATE AND/OR
SECONDARY PRODUCTS THEREOF IN TRANSGENIC ORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ERGOSTA-5,7-DIENOL UND/ODER DESSEN BIOSYNTHETISCHEN
ZWISCHEN- UND/ODER FOLGEPRODUKTEN IN TRANSGENEN ORGANISMEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing ergosta-5,7-dienol and/or biosynthetic intermediate and/or secondary
products thereof by cultivating genetically modified organisms. The invention also relates to the genetically modified organisms
themselves, particularly yeasts.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen
biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen sowie die genetisch
veränderten Organismen, insbesondere Hefen selbst.

WO 2004/083407 A1

uk

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Verfahren zur Herstellung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten in transgenen Organismen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Hefen selbst.

10

Ergosta-5,7-dienol und dessen biosynthetischen Zwischenprodukte des Sterolstoffwechsels, wie beispielsweise Farnesol, Geraniol, Squalen und Lanosterol und Zymosterol, sowie dessen biosynthetischen Folgeprodukte des Sterolstoffwechsels, beispielsweise in Säugern, wie beispielsweise Campesterol, Pregnenolon, 17-OH Pregnenolon, Progesteron, 17-OH Progesteron, 11-Deoxycortisol, Hydrocortison, Deoxycorticosteron oder Corticosteron sind Verbindungen mit hohem wirtschaftlichen Wert.

15

20

Ergosta-5,7-dienol kann als Ausgangsverbindung für die Herstellung von Steroidhormonen über Biotransformationen, chemische Synthese oder biotechnologische Herstellung dienen.

25

Hydrocortison hat einen schwachen glucocorticoiden Effekt und ist eine gesuchte Ausgangsverbindung für die Synthese von Wirkstoffen mit starker entzündungshemmender, abortiver oder antiproliferativen Wirkung.

30

Squalen wird als Synthesebaustein für die Synthese von Terpenen benutzt. In hydrierter Form findet es als Squalan Verwendung in Dermatologie und Kosmetik sowie in verschiedenen Derivaten als Inhaltsstoff von Haut- und Haarpflegemitteln.

35

Weiterhin wirtschaftlich nutzbar sind Sterole, wie Zymosterol und Lanosterol, wobei Lanosterol Roh- und Synthesepivotal für die chemische Synthese von Saponinen und Steroidhormonen ist. Wegen seiner guten Hautpenetration und Spreadingeigenschaften dient Lanosterol als Emulsionshilfs- und Wirkstoff für Hautcremes.

40

Ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten ist daher von großer Bedeutung.

Besonders wirtschaftliche Verfahren sind biotechnologische Verfahren unter Ausnutzung natürlicher oder durch genetische Veränderung optimierter Organismen, die

2

Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetische Zwischen- und/oder Folgeprodukte herstellen.

5 Die Gene des Ergosterol-Stoffwechsels in Hefe sind weitgehend bekannt und kloniert, wie beispielsweise

Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase (*HMG*)(Bason M.E. et al,(1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. 10 Mol Cell Biol 8:3797-3808,

die Nukleinsäure kodierend eine trunkierte HMG-CoA-Reduktase (*t-HMG*)(Polakowski T, Stahl U, Lang C.(1998) Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. Appl Microbiol Biotechnol. Jan; 15 49(1):66-71,

die Nukleinsäure kodierend eine Lanosterol-C14-Demethylase (*ERG11*) (Kalb VF, Loper JC, Dey CR, Woods CW, Sutter TR (1986) Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 45(3):237-45,

20

die Nukleinsäure kodierend eine Squalenepoxidase (*ERG1*) (Jandrošitz, A., et al (1991) The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. Gene 107:155-160 und

25 und Nukleinsäuren kodierend eine Squalensynthetase (*ERG9*) (Jennings, S.M., (1991): Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. Proc Natl Acad Sci USA. Jul15;88(14):6038-42).

30 Weiterhin sind Verfahren bekannt, die eine Erhöhung des Gehalts an spezifischen Intermediaten und Endprodukten des Sterolstoffwechsels in Hefen und Pilzen zum Ziel haben.

Aus T. Polakowski, Molekularbiologische Beeinflussung des Ergosterolstoffwechsels der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Shaker Verlag Aachen, 1999, Seite 59 bis 66 ist 35 bekannt, dass die Erhöhung der Expressionsrate der HMG-CoA-Reduktase zu einer leichten Erhöhung des Gehalts an frühen Sterolen, wie Squalen führt, während sich der Gehalt an späteren Sterolen, wie Ergosterol nicht signifikant ändert, bzw. tendentiell eher abnimmt.

40 Tainaka et al., J, Ferment. Bioeng. 1995, 79, 64-66, beschreiben ferner, dass die Überexpression von *ERG11* (Lanosterol-C14-Demethylase) zu einer Anreicherung von

3

4,4-Dimethylzymosterol jedoch nicht von Ergosterol führt. Die Transformante zeigte gegenüber dem Wildtyp einen, je nach Fermentationsbedingungen, um den Faktor 1,1 bis 1,47 gesteigerten Zymosterolgehalt.

- 5 WO 99/16886 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol in Hefen, die eine Kombination der Gene *h*HMG, ERG9, SAT1 und ERG1 überexprimieren.

- EP 486 290 offenbart ein Verfahren zur Erhöhung von Squalen, Zymosterol, Ergosta-5,7,24(28) trienol und Ergosta-5,7-dienol in Hefe indem man die Expressionsrate der
10 HMG-CoA-Reduktase erhöht und gleichzeitig den Stoffwechselweg der Ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-dehydrogenase, im folgenden auch Δ 22-Desaturase (ERG5) genannt, unterbricht.

- 15 Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass die Ausbeute an Ergosta-5,7-dienol noch nicht befriedigend ist.

- Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein weiteres Verfahren zu Herstellung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten mit vorteilhaften Eigenschaften, wie einer höheren Produktausbeute, zur
20 Verfügung zu stellen.

- Demgemäss wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten gefunden, in dem man Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp

- 25 eine reduzierte Δ 22-Desaturase-Aktivität und

eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase Aktivität und

- 30 eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität und Squalensynthetase-Aktivität

aufweisen.

35

- Unter einer reduzierten Aktivität wird sowohl die reduzierte als auch das komplette Ausschalten der Aktivität verstanden. Eine Reduzierung einer Aktivität umfasst demnach auch eine mengenmässige Verringerung des entsprechenden Proteins in dem Organismus bis hin zu einem vollständigen Fehlen des entsprechenden Proteins,
40 beispielsweise zu testen durch eine fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden

Enzymaktivität oder eine fehlende immunologische Nachweisbarkeit der entsprechenden Proteine.

5 Unter $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer $\Delta 22$ -Desaturase verstanden.

Unter einer $\Delta 22$ -Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Ergosta-5,7-dienol in Ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 β -ol umzuwandeln.

10 Dementsprechend wird unter $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein $\Delta 22$ -Desaturase umgesetzte Menge Ergosta-5,7-dienol bzw. gebildete Menge Ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 β -ol verstanden.

15 Bei einer reduzierten $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein $\Delta 22$ -Desaturase die umgesetzte Menge Ergosta-5,7-dienol bzw. die gebildete Menge Ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 β -ol reduziert.

20 Vorzugsweise erfolgt diese Reduzierung der $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität auf mindestens 90%, weiter bevorzugt auf mindestens 70%, weiter bevorzugt auf mindestens 50%, weiter bevorzugt auf mindestens 30%, bevorzugter auf mindestens 10%, noch bevorzugter auf mindestens 5%, insbesondere auf 0% der $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität des Wildtyps. Besonders bevorzugt ist demnach ein Ausschalten der $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität im Organismus.

25

Die Bestimmung der Aktivität der $\Delta 22$ -Desaturase (ERG5) kann wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden:

30 Verschiedene Konzentrationen von Ergosta-5,7-dienol, aufgereinigt aus *erg5* Mutanten von *S. cerevisiae* (Parks et al, 1985. Yeast sterols.yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Methods Enzymol. 111:333-346) und 50 μ g dilaurylphosphatidylcholin werden gemischt und mit Ultraschall behandelt, bis eine weisse Suspension entsteht. Aufgearbeitete Mikrosomen werden hinzugegeben (1 ml)(3 mg/ml Protein). NADPH (Endkonzentration, 1 mM) wird dem Testansatz zum Start der
35 Enzymreaktion hinzugegeben. Der Ansatz wird 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 ml Methanol gestoppt und Sterole werden verseift durch Zugabe von 2 ml 60% (wt/vol) KOH in Wasser. Der Ansatz wird bei 90°C for 2 h inkubiert. Der Ansatz wird nach dem Abkühlen dreimal mit 5 ml Hexan extrahiert und durch Rotationsverdampfung eingeeengt. Anschliessend werden die Sterole 1h bei 60°C

mit *bis*(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid (50 µl in 50 µl Toluol) silyliert. Die Sterole werden durch Gas Chromatographie-Massen Spektroskopie (GC-MS) (beispielsweise Model VG 12-250 gas chromatograph-mass spectrometer; VG Biotech, Manchester, United Kingdom) analysiert. Das entstandene Δ^{22} -desaturierte Intermediat kann
5 abhängig von der eingesetzten Menge an Substrat identifiziert werden. Als Referenz dienen Mikrosomen, die nicht mit Substrat inkubiert werden.

Dieses Verfahren ist eine Abwandlung des in Lamb et al: Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol delta²²-desaturase from the pathogenic
10 fungus *Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jul;43(7):1725-8., beschriebenen Verfahrens.

Die Reduzierung der Δ^{22} -Desaturase-Aktivität kann unabhängig voneinander durch unterschiedliche zellbiologische Mechanismen erfolgen, beispielsweise durch Inhibition
15 der entsprechenden Aktivität auf Proteinebene, beispielsweise durch Zugabe von Inhibitoren der entsprechenden Enzyme oder durch Reduzierung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, codierend eine Δ^{22} -Desaturase, gegenüber dem Wildtyp.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der Δ^{22} -Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Reduzierung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, codierend eine Δ^{22} -Desaturase.

25 Die Reduzierung der Genexpression der Nukleinsäuren, codierend eine Δ^{22} -Desaturase, gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch

a) Einbringen von Nukleinsäuresequenzen, welche zu einer antisense-
30 Nukleinsäuresequenz transkribierbar sind, die zur Inhibition der Δ^{22} -Desaturase-Aktivität befähigt ist, beispielsweise indem sie die Expression von endogener Δ^{22} -Desaturase-Aktivität inhibiert,

b) die zu Kosuppression führende Überexpression homologer Δ^{22} -Desaturase-
35 Nukleinsäuresequenzen,

c) die Einführung von Nonsense-Mutationen in das Endogen mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in den Organismus,

d) durch das Einbringen von spezifischen DNA-bindenden Faktoren, beispielsweise Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren, die eine Reduzierung der Genexpression bewirken oder

- 5 e) die Generierung von Knockout-Mutanten, beispielsweise mit Hilfe von T-DNA-Mutagenese oder homologer Rekombination.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der Genexpression der Nukleinsäuren, codierend eine $\Delta 22$ -Desaturase durch Generierung von Knockout-Mutanten, besonders bevorzugt durch homologe Rekombination.

15 Demnach wird bevorzugt ein Organismus verwendet, der kein funktionelles $\Delta 22$ -Desaturase-Gen aufweist.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Generierung von Knockout-Mutanten, also die Deletion des Ziellocus $\Delta 22$ -Desaturase-Gen bei gleichzeitiger Integration einer Expressionskassette, enthaltend mindestens eine der nachstehend beschriebenen Nukleinsäuren, codierend ein Protein dessen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp erhöht wird, durch homologe Rekombination.

25 Dazu können Nukleinsäurekonstrukte verwendet werden, die neben den nachstehend beschriebenen Expressionskassetten, enthaltend Promotor, kodierende Sequenz und gegebenenfalls Terminator und neben einem nachstehend beschriebenen Selektionsmarker am 3'- und 5'-Ende Nukleinsäuresequenzen enthalten, die mit Nukleinsäuresequenzen am Anfang und am Ende des zu deletierenden Gens identisch sind.

30 Vorzugsweise kann der Selektionsmarker nach der Selektion durch Rekombinase-Systeme wieder entfernt werden, beispielsweise durch loxP-Signale am 3'- und 5'-Ende des Selektionsmarkers unter Verwendung einer Cre-Rekombinase (Cre-LoxP-System).

35 Im bevorzugten Organismus *Saccharomyces cerevisiae* bedeutet das $\Delta 22$ -Desaturase-Gen das Gen ERG5 (SEQ. ID. NO. 1). SEQ. ID. NO. 2 stellt die entsprechende $\Delta 22$ -Desaturase aus *Saccharomyces cerevisiae* dar (Skaggs, B.A. et al.,: Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis, Gene. 1996 Feb 22; 169(1):105-9.).

Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase) verstanden.

5 Unter einer HMG-CoA-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A in Mevalonat umzuwandeln.

10 Dementsprechend wird unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. gebildete Menge Mevalonat verstanden.

15 Bei einer erhöhten HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase die umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. die gebildete Menge Mevalonat erhöht.

20 Vorzugweise beträgt diese Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität des Wildtyps.

25 Die Bestimmung der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase erfolgt wie in Th. Polakowski, Molekularbiologische Beeinflussung des Ergosterolstoffwechsels der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Shaker-Verlag, Aachen 1999, ISBN 3-8265-6211-9, beschrieben.

30 Demgemäß werden 10^9 Hefe-Zellen einer 48 h alten Kultur durch Zentrifugation (3500xg, 5 min) geerntet und in 2 ml Puffer I (100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH7,0) gewaschen. Das Zellpellet wird in 500 μ l Puffer 1 (cytosolische Proteine) oder 2 (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH7,0; 1% Triton X-100) (Gesamtproteine) aufgenommen, und es wird 1 μ l 500 mM PMSF in Isopropanol zugegeben. Zu den Zellen kommen 500 μ l Glasperlen (d= 0,5 mm), und die Zellen werden durch 5x eine Minute Vortexen aufgeschlossen. Die Flüssigkeit zwischen den Glasperlen wird in ein neues Eppi überführt. Zellreste bzw. Membranbestandteile werden durch 15 min Zentrifugieren 35 (14000xg) abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues Eppi überführt und stellt die Proteinfraction dar.

Die Aktivität der HMG-CoA Aktivität wird durch Messung des Verbrauchs von NADPH+H⁺ bei der Reduktion von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, das als Substrat

zugesetzt wird, bestimmt.

5 In einem Testansatz von 1000 μ l werden 20 μ l Hefeproteinisolat mit 910 μ l Puffer I; 50 μ l 0,1 M DTT und 10 μ l 16 mM NADPH+H⁺ gegeben. Der Ansatz ist auf 30°C temperiert und wird für 7,5 min bei 340 nm im Photometer gemessen. Die Abnahme an NADPH, die in diesem Zeitraum gemessen wird, ist die Abbaurate ohne Substratzugabe und wird als Hintergrund berücksichtigt.

10 Danach erfolgt die Zugabe von Substrat (10 μ l 30 mM HMG-CoA), und es werden weitere 7,5 min gemessen. Die Berechnung der HMG-CoA-Reduktase Aktivität erfolgt durch die Bestimmung der spezifischen NADPH-Abbaurate.

15 Unter Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Lanosterol-C14-Demethylase verstanden.

Unter einer Lanosterol-C14-Demethylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lanosterol in 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol umzuwandeln.

20 Dementsprechend wird unter Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Lanosterol-C14-Demethylase umgesetzte Menge Lanosterol bzw. gebildete Menge 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol verstanden.

25 Bei einer erhöhten Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Lanosterol-C14-Demethylase die umgesetzte Menge Lanosterol bzw. die gebildete Menge 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol erhöht.

30 Vorzugweise beträgt diese Erhöhung der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugt mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität des Wildtyps.

35 Die Bestimmung der Aktivität der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität erfolgt wie in Omura, T and Sato, R. (1964) The carbon monoxide binding pigment in liver microsomes. J.Biol.Chem. 239, 2370-2378, beschrieben. Bei diesem Test ist die Menge an P450-Enzym als Holoenzym mit gebundenem Häm semi-quantifizierbar. Das (aktive) Holoenzym (mit Häm) kann durch CO reduziert werden und nur das CO-reduzierte Enzym weist ein Absorptionsmaximum bei 450 nm auf. So ist das Absorptionsmaxi-
40

mum bei 450 nm ein Maß für die Aktivität der Lanosterol-C14-Demethylase.

5 Zur Durchführung der Aktivitätsbestimmung wird eine Microsomen-Fraktion (4-10 mg/ml Protein in 100 mM Kaliumphosphat Puffer) 1:4 verdünnt, so dass die für den Test eingesetzte Protein Konzentration 2 mg/ml beträgt. Der Test wird direkt in einer Küvette durchgeführt.

10 Zu den Microsomen wird eine Spartelspitze Dithionite ($S_2O_4Na_2$) zugeben. Mit einem Spektralphotometer wird die Baselinie aufgenommen im Bereich von 380-500 nm.

Anschliessend werden ca. 20-30 Blasen von CO durch die Probe gesprudelt. Die Absorbtion wird nun im selben Bereich gemessen. Die Höhe der Absorbtion bei 450 nm entspricht dem Anteil an P450 Enzym im Testansatz.

15 Unter Squalenepoxidase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Squalenepoxidase verstanden.

Unter einer Squalenepoxidase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Squalen in Squalenepoxid umzuwandeln.

20 Dementsprechend wird unter Squalenepoxidase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Squalenepoxidase umgesetzte Menge Squalen bzw. gebildete Menge Squalenepoxid verstanden.

25 Bei einer erhöhten Squalenepoxidase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Squalenepoxidase die umgesetzte Menge Squalen bzw. die gebildete Menge Squalenepoxid erhöht.

30 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Squalenepoxidase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der Squalenepoxidase-Aktivität des Wildtyps.

35 Die Bestimmung der Aktivität der Squalenepoxidase erfolgt wie in Leber R, Landl K, Zinser E, Ahorn H, Spok A, Kohlwein SD, Turnowsky F, Daum G. (1998) Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles, Mol. Biol. Cell. 1998, Feb;9(2):375-86, beschrieben.

10

Diese Methode enthält 0,35 bis 0,7 mg microsomales Protein oder 3,5 bis 75 μ g Lipidpartikel Protein in 100mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 mM FAD, 3 mM NADPH, 0,1 mM squalene 2,3-epoxidase cyclase inhibitor U18666A, 32 μ M [3 H]Squalen dispergiert in 0,005% Tween 80 in einem Gesamtvolumen von 500 μ l.

5

Der Test wird bei 30°C durchgeführt. Nach einer Vorbehandlung für 10 min, wird die Reaktion durch Zugabe von Squalen gestartet und nach 15, 30 oder 45 min durch Lipid Extraktion mit 3 ml Chloroform/Methanol (2:1 vol/vol) und 750 μ l 0,035 % MgCl_2 beendet.

10

Die Lipide werden unter Stickstoff getrocknet und in 0,5 ml Chloroform/Methanol (2:1 vol/vol) rückgelöst. Für eine Dünnschicht Chromatographie werden Teile auf eine Silica Gel 60 Platte (0,2 mm) gegeben und mit Chloroform als Laufmittel aufgetrennt. Die Positionen, die [3 H]2,3-oxidosqualen und [3 H]Squalene enthalten wurden ausgekratzt und mit einem Szintillationzähler quantifiziert.

15

Unter Squalensynthetase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Squalensynthetase verstanden.

20 Unter einer Squalensynthetase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Farnesylpyrophosphat in Squalen umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Squalensynthetase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Squalensynthetase umgesetzte Menge Farnesylpyrophosphat bzw. gebildete Menge Squalen verstanden.

25

Bei einer erhöhten Squalensynthetase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Squalensynthetase die umgesetzte Menge Farnesylpyrophosphat bzw. die gebildete Menge Squalen erhöht.

30

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Squalensynthetase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der Squalensynthetase-Aktivität des Wildtyps.

35

Die Bestimmung der Aktivität der Squalensynthetase kann wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden:

40

Die Tests enthalten 50 mM Mops, pH 7.2, 10 mM MgCl₂, 1% (v/v) Tween-80, 10% (v/v) 2-propanol, 1 mM DTT, 1 mg/mL BSA, NADPH, FPP (or PSPP) und Mikrosomen (3mg Proteingehalt) in einem Gesamtvolumen von 200 μ l in Glassröhrchen. Reaktionen mit radioaktivem Substrat [1-³H]FPP (15-30 mCi/ μ mol) werden bei 30 °C für 30 min
5 inkubiert und der Suspensionsansatz mit einem Volumen von 1:1 (v/v) 40% wässriges KOH:Methanol aufgefüllt. Flüssiges NaCl wird zur Sättigung der Lösung hinzugegeben und 2 ml Ligroin enthaltend 0.5% (v/v) Squalen werden ebenfalls zugefügt.

Die Suspension wurde für 30 s gevortext. Je 1 ml der Ligroin Schicht wird in einer
10 Pasteur Pipette auf eine gepackte 0.5 \times 6 cm Aluminium Säule (80-200 mesh, Fisher) gegeben. Die Säule ist mit 2 ml Ligroin mit 0.5% (v/v) Squalen präequilibriert. Anschließend wird die Säule mit 5 \times 1 ml Toluol enthaltend 0.5% (v/v) Squalen eluiert. Die Radioaktivität von Squalen wird in Cytoscint (ICN) Szintillations Cocktail mit einem Szintillationszähler (Beckman) gemessen.

15 Dieses Verfahren ist eine Abwandlung der in Radisky et al., *Biochemistry*. 2000 Feb 22;39(7):1748-60, Zhang et al. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 133-143 und Poulter, C. D. et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 3734-3739, beschriebenen Verfahren.

20 Unter einem Wildtyp wird der entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangsorganismus verstanden. Vorzugsweise und insbesondere in Fällen in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zuordenbar ist, wird unter Wildtyp für die Reduzierung der Δ 22-Desaturase-Aktivität, die Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, die Erhöhung der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, die Erhöhung der Squalenepoxidase-Aktivität und die Erhöhung der Squalensynthetase-Aktivität sowie
25 für die Erhöhung des Gehalts an Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten ein Referenzorganismus verstanden. Dieser Referenzorganismus ist vorzugsweise der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* AH22.
30

Die Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität oder Squalensynthetase-Aktivität kann unabhängig voneinander durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder
35 durch Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, also Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase oder Squalensynthetase gegenüber dem Wildtyp.

12

Die Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäure gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung der entsprechenden Gene durch Aktivatoren, also durch Induzierung des HMG-CoA-Reduktase-Gens, des Lanosterol-C14-Demethylase-Gens, des Squalenepoxidase-Gens, oder des Squalensynthetase-Gens durch Aktivatoren oder durch
5 Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien der entsprechenden Nukleinsäuren, also durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase oder Squalensynthetase in den Organismus.

10 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase oder Squalensynthetase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen, insbesondere der Hefen eigenen, endogenen HMG-CoA-Reduktasen, Lanosterol-C14-
15 Demethylasen, Squalenepoxidasen oder Squalensynthetasen verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase oder Squalensynthetase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine
20 erhöhte Expressionsrate des entsprechenden Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase oder Squalensynthetase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch
25 besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Desweiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression endogener HMG-CoA-Reduktase-, Lanosterol-C14-Demethylase-, Squalenepoxidase- oder Squalensynthetase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht
30 vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in
35 WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpressi-
40

on einer Nukleinsäure codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase durch Einbringen von
5 einer oder mehrer Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes Lanosterol-C14-Demethylase-Gen (ERG11), also jede Nukleinsäuren die eine Lanosterol-C14-Demethylase codiert, verwendet werden. Bei
10 genomischen Lanosterol-C14-Demethylase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Lanosterol-C14-Demethylase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Lanosterol-C14-Demethylase-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Kalb VF, Loper JC, Dey CR, Woods CW, Sutter TR (1986) Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 45(3):237-45), *Candida albicans* (Lamb DC, Kelly
20 DE, Baldwin BC, Gozzo F, Boscott P, Richards WG, Kelly SL (1997) Differential inhibition of *Candida albicans* CYP51 with azole antifungal stereoisomers. FEMS Microbiol Lett 149(1):25-30), *Homo sapiens* (Stromstedt M, Rozman D, Waterman MR. (1996) The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 alpha-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. Arch
25 Biochem Biophys 1996 May 1;329(1):73-81c) oder *Rattus norvegicus*, Aoyama Y, Funae Y, Noshiro M, Horiuchi T, Yoshida Y. (1994) Occurrence of a P450 showing high homology to yeast lanosterol 14-demethylase (P450(14DM)) in the rat liver. Biochem Biophys Res Commun. Jun 30;201(3):1320-6)

30 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Lanosterol-C14-Demethylase-Gen vor.

Die Anzahl der Lanosterol-C14-Demethylase-Gene in den erfindungsgemäßen
35 transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%,
5 bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6, und die die enzymatische Eigenschaft einer Lanosterol-C14-Demethylase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 6 stellt die Aminosäuresequenz der Lanosterol-C14-Demethylase aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.
10

Weitere Beispiele für Lanosterol-C14-Demethylasen und Lanosterol-C14-Demethylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 2 leicht auffinden.
15

Weitere Beispiele für Lanosterol-C14-Demethylasen und Lanosterol-C14-Demethylase-gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 5 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
20

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.
25

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.
30

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.
35

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison,
40

15

Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

- 5 Multiple alignment parameter:
 - Gap penalty 10
 - Gap length penalty 10
 - Pairwise alignment parameter:
 - K-tuple 1
- 10 Gap penalty 3
 - Window 5
 - Diagonals saved 5

15 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

20 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Lanosterol-C14-Demethylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. NO. 6).

25 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

30 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismus-spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 5 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 5 stellt die genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF S0001049) dar, die die Lanosterol-C14-Demethylase der Sequenz

SEQ ID NO. 6 codiert.

Alle vorstehend erwähnten Lanosterol-C14-Demethylase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase indem man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase in den Organismus einbringt, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp, einer reduzierten Regulation unterliegt.

Unter einer reduzierten Regulation verglichen mit dem Wildtyp, wird eine im Vergleich zum vorstehend definierten Wildtyp verringerte, vorzugsweise keine Regulation auf Expressions- oder Proteinebene verstanden.

Die reduzierte Regulation kann vorzugsweise durch einen im Nukleinsäurekonstrukt mit der kodierenden Sequenz funktionell verknüpften Promotor erreicht werden, der in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp-Promoter einer reduzierten Regulation unterliegt.

Beispielsweise unterliegt der mittlere ADH-Promotor in Hefe nur einer reduzierten Regulation und ist daher insbesondere als Promotor im vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukt bevorzugt.

Dieses Promotorfragment des *ADH12s* Promotors, im folgenden auch *ADH1* bezeichnet, zeigt eine annähernd konstitutive Expression (Ruohonen L, Penttilä M, Keranen S. (1991) Optimization of *Bacillus alpha*-amylase production by *Saccharomyces cerevisi-*

ae. Yeast. May-Jun;7(4):337-462; Lang C, Looman AC. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. Dec;44(1-2):147-56.), so dass die transkriptionelle Regulation nicht mehr über Intermediate der Ergosterolbiosynthese abläuft.

5

Weitere bevorzugte Promotoren mit reduzierter Regulation sind konstitutive Promotoren wie beispielsweise der TEF1-Promotor aus Hefe, der GPD-Promotor aus Hefe oder der PGK-Promotor aus Hefe (Mumberg D, Muller R, Funk M.(1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds.

10 Gene. 1995 Apr 14;156(1):119-22; Chen CY, Oppermann H, Hitzeman RA.(1984) Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. Dec 11;12(23):8951-70.).

15 Die reduzierte Regulation kann in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dadurch erreicht werden, dass man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit der Organismus eigenen, orthologen Nukleinsäure, einer reduzierten Regulation unterliegt.

20 Besonders bevorzugt ist die Verwendung einer Nukleinsäure, die nur den katalytischen Bereich der HMG-CoA-Reduktase kodiert (trunkierte (t-)HMG-CoA-Reduktase) als Nukleinsäure, codierend eine HMG-CoA-Reduktase. Diese in EP 486 290 und WO 99/16886 beschriebene Nukleinsäure (t-HMG) kodiert nur den katalytisch aktiven Teil der HMG-CoA-Reduktase, die für die Regulation auf Proteinebene verantwortliche
25 Membran-Domäne fehlt. Diese Nukleinsäure unterliegt somit, insbesondere in Hefe, einer reduzierten Regulation und führt zu einer Erhöhung der Genexpression der HMG-CoA-Reduktase.

30 Der Einbau des vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukts in den Wirtsorganismus kann entweder chromosomal unter Verwendung von Integrationsvektoren oder episomal unter Verwendung von episomalen Plasmiden, enthaltend jeweils das vorstehend beschriebene Nukleinsäurekonstrukt erfolgen.

35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man Nukleinsäuren, vorzugsweise via vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt, ein, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4, und die die enzymatische Eigenschaft einer HMG-CoA-Reduktase aufweisen.

40

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 4 stellt die Aminosäuresequenz der trunkierten HMG-CoA-Reduktase (t-HMG) dar.

5 Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und damit auch für die auf den katalytischen Bereich reduzierten t-HMG-CoA-Reduktasen bzw. die kodierenden Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 4 leicht auffinden.

10

Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und damit auch für die auf den katalytischen Bereich reduzierten t-HMG-CoA-Reduktasen bzw. die kodierenden Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 3 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch 15 Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Besonders bevorzugt verwendet man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 3 als Nukleinsäure, kodierend eine trunkierte HMG-CoA-Reduktase.

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die reduzierte Regulation dadurch erreicht, dass man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit der Organismus eigenen, orthologen Nukleinsäure, einer reduzierten Regulation unterliegt und einen Promotor verwendet, der in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp- 25 Promoter einer reduzierten Regulation unterliegt.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung Squalenepoxidase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalenepoxidase.

30

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalenepoxidase durch Einbringen von einer oder mehrer Nukleinsäuren codierend Squalenepoxidase in den Organismus.

35 Dazu kann prinzipiell jedes Squalenepoxidase-Gen (ERG1), also jede Nukleinsäuren die eine Squalenepoxidase codiert, verwendet werden. Bei genomischen Squalenepoxidase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Squalenepoxidase zu exprimieren, bevor- 40 zugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu

verwenden.

Beispiele für Nukleinsäuren kodierend eine Squalenepoxidase sind Nukleinsäuren, codierend eine Squalenepoxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Jandrositz, A., et al
5 (1991) The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. Gene 107:155-160, aus *Mus musculus* (Kosuga K, Hata S, Osumi T, Sakakibara J, Ono T. (1995) Nucleotide sequence of a cDNA for mouse squalene epoxidase, Biochim Biophys Acta, Feb 21;1260(3):345-8b), aus *Rattus norvegicus* (Sakakibara J, Watanabe R, Kanai Y, Ono T. (1995) Molecular cloning and
10 expression of rat squalene epoxidase. J Biol Chem Jan 6;270(1):17-20c) oder aus *Homo sapiens* (Nakamura Y, Sakakibara J, Izumi T, Shibata A, Ono T. (1996) Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in HeLa cells., J. Biol. Chem. 1996, Apr 5;271(14):8053-6).

15 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Squalenepoxidase vor.

Die Anzahl der Squalenepoxidase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen
20 Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von
25 dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8, und die die enzymatische Eigenschaft einer Squalenepoxidase aufweisen.

30 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 8 stellt die Aminosäuresequenz der Squalenepoxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

Weitere Beispiele für Squalenepoxidasen und Squalenepoxidase-Gene lassen sich
35 beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 8 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Squalenepoxidase und Squalenepoxidase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 7 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

5

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Squalenepoxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. NO. 8).

- 10 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismus-spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15

Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 7 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 7 stellt die genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF S0003407) dar, die die Squalenepoxidase der Sequenz SEQ ID NO. 8 codiert.

25

Alle vorstehend erwähnten Squalenepoxidase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30

35

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Squalensynthetase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer

40

Nukleinsäure codierend eine Squalensynthetase.

- 5 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalensynthetase durch Einbringen von einer oder mehrer Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase in den Organismus.

- 10 Dazu kann prinzipiell jedes Squalensynthetase-Gen (ERG9), also jede Nukleinsäuren die eine Squalensynthetase codiert, verwendet werden. Bei genomischen Squalensynthetase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Squalensynthetase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

- 15 Beispiele für Nukleinsäuren kodierend eine Squalensynthetase sind Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus *Saccharomyces cerevisiae* (ERG9), (Jennings, S.M., (1991): Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. Proc Natl Acad Sci USA. Jul15;88(14):6038-42), Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus *Botryococcus braunii* Okada (Devarenne, T.P. et al.:
20 Molecular characterization of squalene synthase from the green microalga *Botryococcus braunii*, race B, Arch. Biochem. Biophys. 2000, Jan15, 373(2):307-17), Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus *Potato tuber* (Yoshioka H. et al.: cDNA cloning of sesquiterpene cyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with *Phytophthora infestans*, Plant. Cell. Physiol. 1999, Sep;40(9):993-8) oder Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus *Glycyrrhiza glabra* (Hayashi, H. et al.: Molecular cloning and characterization of two cDNAs for *Glycyrrhiza glabra* squalene synthase, Biol. Pharm. Bull. 1999, Sep;22(9):947-50.

- 30 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Squalensynthetase-Gen vor.

- 35 Die Anzahl der Squalensynthetase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

- 40 Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 10 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete-

te Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 10, und die die enzymatische Eigenschaft einer Squalensynthetase aufweisen.

5

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 10 stellt die Aminosäuresequenz der Squalensynthetase (ERG9) aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

10 Weitere Beispiele für Squalensynthetasen und Squalensynthetase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID. NO. 10 leicht auffinden.

15 Weitere Beispiele für Squalensynthetase und Squalensynthetase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 9 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

20 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Squalensynthetase aus *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. NO. 10).

25 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

30 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismus-spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 9 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 9 stellt die genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YHR190W) dar, die die Squalensynthetase der Sequenz SEQ. ID. NO. 10

codiert.

Alle vorstehend erwähnten Squalensynthetase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase Aktivität und eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität und Squalensynthetase-Aktivität aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase Aktivität und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase -Aktivität oder Squalensynthetase -Aktivität aufweisen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weisen die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase Aktivität und eine erhöhte Aktivität mindestens zwei der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Lanosterol-C14-Demethylase -Aktivität, Squalenepoxidase -Aktivität und Squalensynthetase -Aktivität auf.

Besonders bevorzugte Kombinationen sind eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase Aktivität und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und Squalenepoxidase Aktivität oder Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und Squalensynthetase-Aktivität oder eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität und Squalensynthetase-Aktivität.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weisen die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase Aktivität und eine erhöhte

Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Squalenepoxidase -Aktivität und eine erhöhte Squalensynthetase-Aktivität auf.

5 Unter Organismen oder genetisch veränderten Organismen werden erfindungsgemäß beispielsweise Bakterien, insbesondere Bakterien der Gattung *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus spec.* oder *Streptomyces spec.*,

beispielsweise Hefen, insbesondere Hefen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* oder *Klyveromyces spec.*

10 beispielsweise Pilze, insbesondere Pilze der Gattung *Aspergillus spec.*, *Penicillium spec.* oder *Dictyostelium spec.*

15 sowie beispielsweise auch Insektenzelllinien verstanden, die in der Lage sind, als Wildtyp oder durch vorherige genetische Veränderung Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten herzustellen.

Besonders bevorzugte Organismen oder genetisch veränderte Organismen sind Hefen, insbesondere der Spezies *Saccharomyces cerevisiae*, insbesondere die

20 Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* AH22, *Saccharomyces cerevisiae* GRF, *Saccharomyces cerevisiae* DBY747 und *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

Unter den biosynthetischen Zwischenprodukten des Ergosta-5,7-dienol, werden alle Verbindungen verstanden, die im verwendeten Organismus bei der Biosynthese von

25 Ergosta-5,7-dienol als Zwischenprodukte auftreten, vorzugsweise die Verbindungen Mevalonat, Farnesylpyrophosphat, Geraniolpyrophosphat, Squalenepoxid, 4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol, 4,4 Dimethylzymosterol, Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol , Zymosteron und Zymosterol.

30 Unter den biosynthetischen Folgeprodukten des Ergosta-5,7-dienol, werden alle Verbindungen verstanden, die sich im verwendeten Organismus biosynthetisch von Ergosta-5,7-dienol ableiten, dass heißt bei denen Ergosta-5,7-dienol als Zwischenprodukt auftritt. Dies können Verbindungen sein, die der verwendete Organismus natürlicherweise aus Ergosta-5,7-dienol herstellt.

35 Es werden aber auch Verbindungen verstanden, die erst durch Einbringen von Genen und Enzymaktivitäten aus anderen Organismen, zu denen der Ausgangsorganismus kein orthologes Gen aufweist, im Organismus aus Ergosta-5,7-dienol hergestellt werden können.

40

Beispielsweise können durch Einbringen von weiteren pflanzlichen Genen und/oder Säugergenen in Hefe, biosynthetische Folgeprodukte aus Ergosta-5,7-dienol in der Hefe hergestellt werden, die natürlich nur in Pflanzen und/oder Säugern vorkommen.

- 5 Das Einbringen von beispielsweise Nukleinsäuren kodierend eine pflanzliche $\Delta 7$ -Reduktase (DWF5) oder deren funktionelle Äquivalente oder Varianten und von Nukleinsäuren, kodierend reife Formen von CYP11A1, ADX(FDX1), ADR (FDXR) und 3β -HSD) oder deren funktionelle Äquivalente oder Varianten in Hefe führt zur Biosynthese von Progesteron in der Hefe. Eine ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise und der Methoden und Materialien zur entsprechenden genetischen Veränderung der Hefe ist in C. Duport et al., Nat. Biotechnol. 1998, 16, 186-189 und in den
- 10 darin angegebenen Literaturziten offenbart, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird.
- 15 Das Einbringen von beispielsweise Nukleinsäuren kodierend eine pflanzliche $\Delta 7$ -Reduktase (DWF5) oder deren funktionelle Äquivalente oder Varianten und von Nukleinsäuren, kodierend reife Formen von CYP11A1, ADX(FDX1) und ADR (FDXR) oder deren funktionelle Äquivalente oder Varianten und von Nukleinsäuren, kodierend mitochondriale Formen von ADX und CYP11B1, 3 β -HSD, CYP17A1 und CYP21A1
- 20 oder deren funktionelle Äquivalente oder Varianten in Hefe führt zur Biosynthese von Hydrocortison, 11-Deoxycortisol, Corticosteron und Acetylpregnenolon.
- Zur weiteren Steigerung des Gehalts an biosynthetischen Folgeprodukten des Ergosta-5,7-dienol, wie beispielsweise Hydrocortison, ist es zusätzlich vorteilhaft, abfließende
- 25 Stoffwechselwege, also Biosynthesewege die nicht zum gewünschten Produkt führen, zu unterdrücken. Beispielsweise führt die Reduzierung der Aktivitäten der Genprodukte von ATF2, GCY1 und YPR1, besonders bevorzugte die Deletion dieser Aktivitäten in Hefe zu einer weiteren Steigerung des Gehalts an Hydrocortison.
- 30 Eine ausführliche Beschreibung dieser Vorgehensweise und der Methoden und Materialien zur entsprechenden genetischen Veränderung der Hefe ist in F.M. Szczepara et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21, 143-149 und in den darin angegebenen Literaturziten offenbart, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird.
- 35 Unter den biosynthetischen Folgeprodukten des Ergosta-5,7-dienol werden daher insbesondere Campesterol, Pregnenolon, 17-OH Pregnenolon, Progesteron, 17-OH Progesteron, 11-Deoxycortisol, Hydrocortison, Deoxycorticosteron und/oder Corticosteron verstanden.

Bevorzugte biosynthetische Folgeprodukte sind Progesteron, Corticosteron und Hydrocortison, besonders bevorzugt Hydrocortison.

5 Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen stellen teilweise selbst Steroidhormone da und können zu therapeutischen Zwecken verwendet werden.

10 Ferner können die hergestellten Verbindungen, wie beispielsweise Ergosta-5,7-dienol oder Hydrocortison zu Herstellung von Steroidhormonen oder zur Synthese von Wirkstoffen mit starker entzündungshemmender, abortiver oder antiproliferativen Wirkung über Biotransformation, chemische Synthese oder biotechnologische Herstellung verwendet werden.

15 Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen, im folgenden auch transgene Organismen bezeichnet, ein Ernten der Organismen und ein Isolieren von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus den Organismen angeschlossen.

20 Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Moose, Hefen und Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren abgetrennt werden.

25 Die Isolierung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus der geernteten Biomasse erfolgt gemeinsam oder jede Verbindung für sich in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie
30 beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierungsverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

35 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines genetisch veränderten Organismus indem man ausgehend von einem Ausgangsorganismus die Δ^{22} -Desaturase-Aktivität reduziert und die HMG-CoA-Reduktase Aktivität erhöht und mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität und Squalensynthetase-Aktivität erhöht.

Die Verfahren zur Deletion des Ziellocus $\Delta 22$ -Desaturase-Gen sind bereits vorstehend ausführlich beschrieben.

5 Die Herstellung der transgenen Organismen, insbesondere Hefen kann vorzugsweise durch Transformation der Ausgangsorganismen, insbesondere Hefen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase und enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase und Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, erfolgen. Die Herstellung der transgenen Organismen erfolgt in dieser Ausführungsform mit einem Nukleinsäurekonstrukt.

15 Dazu können Nukleinsäurekonstrukte verwendet werden, die neben den nachstehend beschriebenen Expressionskassetten, enthaltend Promotor, kodierende Sequenz und gegebenenfalls Terminator und neben einem nachstehend beschriebenen Selektionsmarker am 3'- und 5'-Ende Nukleinsäuresequenzen enthalten, die mit Nukleinsäuresequenzen am Anfang und am Ende des zu deletierenden Gens identisch sind.

20

Die Herstellung der transgenen Organismen kann aber auch vorzugsweise durch Transformation der Ausgangsorganismen, insbesondere Hefen, mit einer Kombination von Nukleinsäurekonstrukten, enthaltend Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase und enthaltend Nukleinsäurekonstrukte oder eine Kombination von Nukleinsäurekonstrukten, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase und Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und diese jeweils mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, erfolgen.

30

Die Herstellung der transgenen Organismen erfolgt in dieser Ausführungsform mit einzelnen Nukleinsäurekonstrukten oder einer Kombination von Nukleinsäurekonstrukten.

35

Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Hefen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

40

Nukleinsäurekonstrukte enthaltend diese Expressionskassette sind beispielsweise Vektoren oder Plasmide.

- 5 Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Hefen gewährleisten.

- 10 Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende einen Terminator und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind.

- 15 Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, gegebenenfalls Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

20

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Plasmide für Hefen und Pilze und Verfahren zur Herstellung von transgenen Hefen, sowie die transgenen Hefen selbst beschrieben.

- 25 Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Organismen, insbesondere in Hefen steuern kann.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen Promotor, der in der Hefe einer reduzierten Regulation unterliegt, wie beispielsweise der mittlere ADH-Promotor.

30

- Dieses Promotorfragment des *ADH12s* Promotors, im folgenden auch *ADH1* bezeichnet, zeigt eine annähernd konstitutive Expression (Ruohonen L, Penttilä M, Keränen S. (1991) Optimization of Bacillus alpha-amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. May-Jun;7(4):337-462; Lang C, Looman AC. (1995) Efficient expression and secretion of Aspergillus niger RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. Dec;44(1-2):147-56.), so dass die transkriptionelle Regulation nicht mehr über Intermediate der Ergosterolbiosynthese abläuft.
- 35

- Weitere bevorzugte Promotoren mit reduzierter Regulation sind konstitutive Promotoren wie beispielsweise der *TEF1*-Promotor aus Hefe, der *GPD*-Promotor aus Hefe oder
- 40

der PGK-Promotor aus Hefe (Mumberg D, Muller R, Funk M.(1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene. 1995 Apr 14;156(1):119-22; Chen CY, Oppermann H, Hitzeman RA.(1984) Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. Dec 11;12(23):8951-70.).

Die Expressionskassette kann auch induzierbare Promotoren, insbesondere chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression der Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase oder Squalensynthetase im Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann.

Derartige Promotoren wie beispielsweise der Cupl-Promotor aus Hefe (Etcheverry T. (1990) Induced expression using yeast copper metallothionein promoter. Methods Enzymol. 1990;185:319-29.), der Gal1-10-Promotor aus Hefe (Ronicke V, Graulich W, Mumberg D, Muller R, Funk M. (1997) Use of conditional promoters for expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, Methods Enzymol.283:313-22) oder der Pho5-Promotor aus Hefe (Bajwa W, Rudolph H, Hinnen A.(1987) PHO5 upstream sequences confer phosphate control on the constitutive PHO3 gene. Yeast. 1987 Mar;3(1):33-42) können beispielsweise benutzt werden.

Als Terminator der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Terminator geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Organismen, insbesondere in Hefen steuern kann.

Bevorzugt ist der Tryptophan-Terminator aus Hefe (TRP1-Terminator).

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase oder Squalensynthetase und gegebenenfalls einem Terminator nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-

Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

5 Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Hefen bevorzugt werden. Diese von Hefen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Hefespezies exprimiert werden.

10 Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

15 Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger
20 als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zum Wirtsorganismus sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschie-
25 dene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und
30 Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die
35 Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder der vorstehend beschriebenen Proteine zur Herstellung von transgenen Organismen, insbesondere

Hefen.

5 Vorzugsweise weisen diese transgenen Organismen, insbesondere Hefen gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ergosta-5,7-dienol und /oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten auf.

10 Daher betrifft die Erfindung ferner die Verwendung der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren oder der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte zur Erhöhung des Gehalts an Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten in Organismen.

15 Die vorstehend beschriebenen Proteine und Nukleinsäuren können zur Herstellung von Ergosta-7,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten in transgenen Organismen verwendet werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom eines Organismus, insbesondere von Hefe wird als Transformation bezeichnet.

20 Dazu können insbesondere bei Hefen an sich bekannte Methoden zur Transformation genutzt werden.

25 Geeignete Methoden zur Transformation von Hefen sind beispielsweise die LiAC-Methode, wie in Schiestl RH, Gietz RD. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier, Curr Genet. Dec;16(5-6):339-46, beschrieben, die Elektroporation wie in Manivasakam P, Schiestl RH. (1993) High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. Nucleic Acids Res. Sep 11;21(18):4414-5, beschrieben oder die Protoplasierung, wie in Morgan AJ. (1983) Yeast strain improvement by protoplast fusion and transformation, Experientia Suppl. 46:155-66 beschrieben.

30 Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor, insbesondere in Plasmide kloniert, die geeignet sind, Hefen zu transformieren, wie beispielsweise die Vektorsysteme Yep24 (Naumovski L, Friedberg EC (1982) Molecular cloning of eucaryotic genes required for excision repair of UV-irradiated DNA: isolation and partial
35 characterization of the RAD3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol Oct;152(1):323-31), Yep13 (Broach JR, Strathern JN, Hicks JB. (1979) Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene. Gene. 1979 Dec;8(1):121-33), die pRS-Serie von Vektoren (Centromer und Episomal) (Sikorski RS, Hieter P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains
40 designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics.

May;122(1):19-27) sowie die Vektorsysteme YCp19 oder pYEXBX.

5 Dementsprechend betrifft die Erfindung weiterhin Vektoren, insbesondere Plasmide enthaltend die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten.

10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen indem man eine vorstehend beschriebene Nukleinsäure oder ein vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt in den Ausgangsorganismus funktionell einführt.

Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Organismen, wobei die genetische Veränderung gegenüber dem Wildtyp

15 die $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität reduziert und

die HMG-CoA-Reduktase Aktivität erhöht und

20 mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität und Squalensynthetase-Aktivität erhöht.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die genetisch veränderten Organismen im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität auf.

30 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weisen die genetisch veränderten Organismen im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase und eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität auf.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weisen die genetisch veränderten Organismen im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase und eine erhöhte Squalensynthetase-Aktivität auf.

35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die genetisch veränderten Organismen im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität auf.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die genetisch veränderten Organismen im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Squalensynthetase-Aktivität auf.

5

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die genetisch veränderten Organismen im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase und eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität und eine erhöhte Squalensynthetase-Aktivität auf.

10

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die genetisch veränderten Organismen im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität und eine erhöhte Squalensynthetase-Aktivität auf.

15

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung dieser Aktivitäten, wie vorstehend erwähnt, unabhängig voneinander durch eine Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, oder Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase gegenüber dem Wildtyp.

20

Die weiter bevorzugten Ausführungsformen der bevorzugten erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen sind vorstehend bei den Verfahren beschrieben.

25

Die vorstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismen weisen gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten auf.

30

Dementsprechend betrifft die Erfindung einen vorstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aufweist.

35

Unter Organismen oder genetisch veränderten Organismen werden erfindungsgemäß beispielsweise Bakterien, insbesondere Bakterien der Gattung *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus spec.* oder *Streptomyces spec.*,

beispielsweise Hefen, insbesondere Hefen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* oder *Kluyveromyces spec.*

5 beispielsweise Pilze, insbesondere Pilze der Gattung *Aspergillus spec.*, *Penicillium spec.* oder *Dictyostelium spec.*

sowie beispielsweise auch Insektenzelllinien verstanden, die in der Lage sind, als Wildtyp oder durch vorherige genetische Veränderung Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten herzustellen.

10

Besonders bevorzugte Organismen oder genetisch veränderte Organismen sind Hefen, insbesondere der Spezies *Saccharomyces cerevisiae*, insbesondere die Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* AH22, *Saccharomyces cerevisiae* GRF, *Saccharomyces cerevisiae* DBY747 und *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

15

Erhöhung des Gehaltes an Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen und/oder Folgeprodukten bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung mindestens einer dieser, eingangs erwähnten Verbindungen in dem genetisch
20 veränderten Organismus gegenüber dem nicht genetisch veränderten Organismus.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen und/oder Folgeprodukten im Vergleich zum Wildtyp wird insbesondere die Erhöhung des Gehaltes mindestens einer der vorstehend erwähnten Verbindungen im
25 Organismus um mindestens 50%, vorzugsweise 100%, bevorzugt 200%, besonders bevorzugt 400% im Vergleich zum Wildtyp verstanden.

Die Bestimmung des Gehalts an mindestens einer der erwähnten Verbindungen erfolgt vorzugsweise nach an sich bekannten analytischen Methoden und bezieht sich
30 vorzugsweise auf die Kompartimente des Organismus in denen Sterole produziert werden.

Die vorliegende Erfindung weist gegenüber dem Stand der Technik folgenden Vorteil auf:

35

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es möglich, den Gehalt an Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten in den Produktionsorganismen zu steigern.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

I. Allgemeine experimentelle Bedingungen

5

1. Restriktion

Die Restriktion der Plasmide (1 bis 10 µg) wurde in 30 µl Ansätzen durchgeführt. Dazu wurde die DNA in 24 µl H₂O aufgenommen, mit 3 µl des entsprechenden Puffers, 1 ml RSA (Rinderserumalbumin) und 2 µl Enzym versetzt. Die Enzymkonzentration betrug 1
10 Unit/µl oder 5 Units/µl je nach DNA Menge. In einigen Fällen wurde dem Ansatz noch 1 µl RNase zugegeben, um die tRNA abzubauen. Der Restriktionsansatz wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrolliert wurde die Restriktion mit einem Minigel.

2. Gelelektrophoresen

15 Die Gelelektrophoresen wurden in Minigel- oder Wide-Minigelapparaturen durchgeführt. Die Minigele (ca. 20 ml, 8 Taschen) und die Wide-Minigele (50 ml, 15 oder 30 Taschen) bestanden aus 1%iger Agarose in TAE. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Proben (10 µl) wurden mit 3 µl Stopperlösung versetzt und aufgetragen. Als Standard diente I-DNA geschnitten mit *Hind*III (Banden bei: 23,1 kb; 9,4 kb;
20 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,0 kb; 0,6 kb). Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 80 V für 45 bis 60 min angelegt. Danach wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung angefärbt und unter UV-Licht mit dem Video-Dokumentationssystem INTAS festgehalten oder mit einem Orange-Filter fotografiert.

25 3. Gelelution

Mittels Gelelution wurden die gewünschten Fragmente isoliert. Der Restriktionsansatz wurde auf mehrere Taschen eines Minigels aufgetragen und aufgetrennt. Nur λ -*Hind*III und eine "Opferspur" wurden in Ethidiumbromidlösung angefärbt, unter UV-Licht betrachtet und das gewünschte Fragment markiert. Dadurch wurde verhindert, dass
30 die DNA der restlichen Taschen durch das Ethidiumbromid und das UV-Licht geschädigt wird. Durch Aneinanderlegen des gefärbten und ungefärbten Gelstücks konnte anhand der Markierung das gewünschte Fragment aus dem ungefärbten Gelstück herausgeschnitten werden. Das Agarosestück mit dem zu isolierenden Fragment wurde in einen Dialyseschlauch gegeben, mit wenig TAE-Puffer luftblasenfrei verschlossen und in die BioRad-Minigelapparatur gelegt. Der Laufpuffer bestand aus 1 x TAE und die Spannung betrug 100 V für 40 min. Danach wurde für 2 min die Strompo-
35 larität gewechselt, um am Dialyseschlauch klebende DNA wieder zu lösen. Der die DNA-Fragmente enthaltende Puffer des Dialyseschlauches wurde in Reaktionsgefäße überführt und damit eine Ethanol Fällung durchgeführt. Dazu wurde der DNA-Lösung

1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat, tRNA (1 µl pro 50 µl Lösung) und dem 2,5 fachen Volumen an eiskaltem 96%igem Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei -20°C inkubiert und dann bei 12000 rpm, 30 min, 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 10 bis 50 µl H₂O (je nach DNA-Menge) aufgenommen.

4. Klenow-Behandlung

Durch die Klenow-Behandlung werden überstehende Enden von DNA Fragmenten aufgefüllt, so dass "blunt-ends" entstehen. Pro 1 µg DNA wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

DNA-Pellet + 11 µl H₂O
+ 1,5 µl 10 x Klenow Puffer
+ 1 µl 0,1 M DTT
+ 1 µl Nucleotide (dNTP 2 mM)
25 + 1 µl Klenow-Polymerase (1 Unit/∞l)

Die DNA sollte dabei aus einer Ethanol-fällung stammen, um zu verhindern, dass Verunreinigungen die Klenow-Polymerase hemmen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C, durch weitere 5 min bei 70 °C wurde die Reaktion abgestoppt. Die DNA wurde aus dem Ansatz durch eine Ethanol-fällung gewonnen und in 10 µl H₂O aufgenommen.

5. Ligation

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden vereinigt. Das Endvolumen von 13,1 µl enthielt ca. 0,5 µl DNA mit einem Vektor-Insert Verhältnis von 1:5. Die Probe wurde 45 Sekunden bei 70 °C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt (ca. 3 min) und dann 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ligationspuffer zugegeben: 2,6 µl 500 mM TrisHCl pH 7,5 und 1,3 µl 100 mM MgCl₂ und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl 500 mM DTT und 1 µl 10 mM ATP und nochmaligen 10 min auf Eis wurde 1 µl Ligase (1 Unit/µl) zugegeben. Die ganze Behandlung sollte möglichst erschütterungsfrei erfolgen, um aneinanderliegende DNA-Enden nicht wieder zu trennen. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14 °C.

35 6. E. coli-Transformation

Kompetente *Escherichia coli* (E. coli) NM522 Zellen wurden mit der DNA des Ligationssatzes transformiert. Als Positiv-Kontrolle lief ein Ansatz mit 50 µg des pScL3 Plasmids und als Null-Kontrolle ein Ansatz ohne DNA mit. Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl 8% PEG-Lösung, 10 µl DNA und 200 µl kompetente Zellen (E.

coli NM522) in ein Tischzentrifugenröhrchen pipettiert. Die Ansätze wurden für 30 min in Eis gestellt und gelegentlich geschüttelt.

Danach erfolgte der Hitzeschock: 1 min bei 42 °C. Für die Regeneration wurde den Zellen 1 ml LB-Medium zugegeben und für 90 min bei 37 °C auf einem Schüttler

- 5 inkubiert. Je 100 µl der unverdünnten Ansätze, einer 1:10 Verdünnung und einer 1:100 Verdünnung wurden auf LB + Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

7. Plasmid-Isolation aus *E. coli* (Minipräp)

- 10 *E. coli*-Kolonien wurden über Nacht in 1,5 ml LB + Ampicillin-Medium in Tischzentrifugenröhrchen bei 37 °C und 120 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen 5 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Jeder Ansatz wurde mit 100 µl 0,2 N NaOH, 1 % SDS-Lösung versetzt, gemischt und für 5 min auf Eis gestellt (Lyse der Zellen). Danach wurden 400 µl Na-
- 15 Acetat/NaCl-Lösung (230 µl H₂O, 130 µl 3 M Natriumacetat, 40 µl 5M NaCl) zugegeben, der Ansatz gemischt und für weitere 15 min auf Eis gestellt (Proteinfällung). Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 11000 rpm wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, in ein Eppendorfgefäß überführt. War der Überstand nicht vollständig klar, wurde nochmal zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 360 µl eisgekühltem Isopropanol versetzt und für 30 min bei -20 °C inkubiert (DNA-Fällung). Die DNA
- 20 wurde abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl eisgekühltem 96%igem Ethanol gewaschen, 15 min bei -20 °C inkubiert und erneut abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde im Speed Vac getrocknet und dann in 100 µl H₂O aufgenommen. Die Plasmid DNA wurde durch
- 25 Restriktionsanalyse charakterisiert. Dazu wurden 10 µl jedes Ansatzes restringiert und in einem Wide-Minigel gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe oben).

8. Plasmid-Aufarbeitung aus *E. coli* (Maxipräp)

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die Maxipräp

- 30 Methode durchgeführt. Zwei Kolben mit 100 ml LB + Ampicillin-Medium wurden mit einer Kolonie bzw. mit 100 µl einer Gefrierkultur, die das zu isolierende Plasmid trägt, angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm bebrütet. Die Anzucht (200 ml) wurde am nächsten Tag in einen GSA-Becher überführt und bei 4000 rpm (2600 x g) 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml TE-Puffer aufgenommen. Zum Abbau der
- 35 Zellwand wurden 1,2 ml Lysozymlösung (20 mg/ml TE-Puffer) zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit 12 ml 0,2 N NaOH, 1 % SDS Lösung und weiteren 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proteine wurden durch die Zugabe von 9 ml gekühlter 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und einer 15 minütigen Inkubation auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation (GSA:
- 40 13000 rpm (27500 x g), 20 min, 4 °C) wurde der Überstand, der die DNA

enthielt, in einen neuen GSA-Becher überführt und die DNA mit 15 ml eiskaltem Isopropanol und einer Inkubation von 30 min bei -20 °C gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 5 ml eisgekühltem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet (ca. 30 - 60 min). Danach wurde es in 1 ml H₂O aufgenommen. Es fand eine Überprüfung des Plasmids durch Restriktionsanalyse statt. Die Konzentration wurde durch Auftragen von Verdün-

5 durch Restriktionsanalyse statt. Die Konzentration wurde durch Auftragen von Verdün-

10 nungen auf einem Minigel bestimmt. Zur Verringerung des Salzgehaltes erfolgte eine 30 - 60 minutige Mikrodialyse (Porengröße 0,025 µm).

9. Hefe-Transformation

10 Für die Hefe-Transformation wurde eine Voranzucht des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* AH22 angesetzt. Ein Kolben mit 20 ml YE-Medium wurde mit 100 µl der Gefrierkultur angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 120 rpm bebrütet. Die Hauptan-

15 zucht erfolgte unter gleichen Bedingungen in Kolben mit 100 ml YE-Medium, die mit 10 µl, 20 µl oder 50 µl der Voranzucht angeimpft wurden.

9.1 Erstellen kompetenter Zellen

Am nächsten Tag wurden die Kolben mittels Thomakammer ausgezählt und es wurde mit dem Kolben, der eine Zellzahl von 3 - 5 x 10⁷ Zellen/ml besaß weitergearbeitet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (GSA: 5000 rpm (4000 x g) 10 min) geerntet. Das

20 Zellpellet wurde in 10 ml TE-Puffer aufgenommen und auf zwei Tischzentrifugenröhr-

25 chen aufgeteilt (je 5 ml). Die Zellen wurden 3 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und noch zweimal mit je 5 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 330 µl Lithiumacetat-Puffer pro 10⁹ Zellen aufgenommen, in einen sterilen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und eine Stunde bei 28 °C geschüttelt. Dadurch waren die Zellen kompetent für die Transformation.

9.2 Transformation

Für jeden Transformationsansatz wurden 15 µl Heringssperma DNA (10 mg/ml), 10 µl zu transformierende DNA (ca. 0,5 µg) und 330 µl kompetente Zellen in ein Tischzentrifugenröhrchen pipettiert und 30 min bei 28 °C (ohne Schütteln) inkubiert. Danach

30 wurden 700 µl 50% PEG 6000 zugegeben und für eine weitere Stunde bei 28 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 5 min bei 42 °C.

100 µl der Suspension wurden auf Selektionsmedium (YNB, Difco) ausplattiert, m auf Leucinprototrophie zu selektionieren. Im Falle der Selektion auf G418 Resistenz wird

35 nach dem Hitzeschock eine Regeneration der Zellen durchgeführt (s. unter 9.3 Regeneration sphase)

9.3 Regenerationsphase

Da der Selektionsmarker die Resistenz gegen G418 ist, brauchten die Zellen Zeit für

40 die Expression des Resistenz-Gens. Die Transformationsansätze wurden mit 4 ml YE-

Medium versetzt und über Nacht bei 28 °C auf dem Schüttler (120 rpm) bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (6000 rpm, 3 min) in 1 ml YE-Medium aufgenommen und davon 100 µl bzw. 200 µl auf YE + G418-Platten ausplattiert. Die Platten wurden mehrere Tage bei 28 °C bebrütet.

5

10. Reaktionsbedingungen für die PCR

Die Reaktionsbedingungen für die Polymerase Chain Reaction müssen für den Einzelfall optimiert werden und sind nicht uneingeschränkt für jeden Ansatz gültig. So kann unter anderem die eingesetzte Menge an DNA, die Salzkonzentrationen und die Schmelztemperatur variiert werden. Für unsere Problemstellung erwies es sich als günstig, in einem Eppendorfhütchen, das für den Einsatz im Thermocycler geeignet war, folgende Substanzen zu vereinigen: Zu 2 µl (= 0,1 U) Super Taq Polymerase wurden 5 µl Super Buffer, 8 µl dNTP's (je 0,625 mM), 5'-Primer, 3'-Primer und 0,2 µg Matrizen DNA, gelöst in soviel Wasser, dass sich ein Gesamtvolumen von 50 µl für den PCR Ansatz ergibt, zugegeben. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und mit einem Tropfen Öl überschichtet. Es wurden zwischen 37 und 40 Zyklen zur Amplifizierung gewählt.

10

15

II. Beispiele

20

Beispiel 1

Expression einer trunkierten HMG-CoA-Reduktase in *S.cerevisiae* GRF

25

Die kodierende Nukleinsäuresequenz für die Expressionskassette aus *ADH*-Promotor-*tHMG*-Tryptophan-Terminator wurde aus dem Vektor YepH2 (Polakowski et al. (1998) Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. Appl Microbiol Biotechnol. Jan;49(1):66-71) durch PCR unter Verwendung von Standardmethoden wie vorstehend unter den allgemeinen Reaktionsbedingungen angegeben amplifiziert.

30

Die hierbei verwendeten Primer sind die DNA Oligomere AtHT-5' (forward: tHMGNotF: 5'- CTGCGGCCGCATCATGGACCAATTGGTGAAAAC TG-3'; SEQ. ID. NO. 11) und AtHT-3' (reverse: tHMGXhoR: 5'- AACTCGAGAGACACATGGTGCTGTTGTGCTTC-3'; SEQ. ID. No. 12).

35

Das erhaltene DNA-Fragment wurde nach einer Klenow-Behandlung in den Vektor pUG6 in die EcoRV-Schnittstelle Blunt-end inkloniert und ergab den Vektor pUG6-*tHMG* (Abbildung 1).

Nach Plasmidisolation wurde ein erweitertes Fragment aus dem Vektor pUG-*tHMG* mittels PCR amplifiziert, so dass das resultierende Fragment aus folgenden Komponenten besteht: *loxP-kanMX-ADH-Promotor-tHMG-Tryptophan-Terminator-loxP*. Als Primer wurden Oligonukleotid-sequenzen ausgewählt, die an den 5' und 3' Überhängen je die 5' oder die 3' Sequenz des *URA3*-Gens enthalten und im annealenden Bereich die Sequenzen der *loxP*-Regionen 5' und 3' des Vektors pUG-*tHMG*. So ist gewährleistet, dass einerseits das gesamte Fragment inklusive *KanR* und *tHMG* amplifiziert werden und andererseits dieses Fragment anschließend in Hefe transformiert werden kann und durch homologe Rekombination dieses gesamte Fragment in den *URA3*-Genlocus der Hefe integriert.

Als Selektionsmarker dient die Resistenz gegen G418. Der resultierende Stamm *S.cerevisiae* GRF-*tH1ura3* ist Uracil auxotroph und enthält eine Kopie des Genes *tHMG* unter der Kontrolle des *ADH*-Promotors und des Tryptophan-Terminators.

Um die Resistenz gegen G418 anschliessend wieder zu entfernen, wird der entstandene Hefestamm mit dem *cre* Rekombinase Vektor pSH47 (Guldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Res. Jul 1;24(13):2519-24.) transformiert. Durch diesen Vektor wird die *cre* Rekombinase in der Hefe exprimiert, was zur Folge hat, dass der Sequenz-Bereich innerhalb der beiden *loxP*-Sequenzen heraus rekombiniert. Dies hat zur Folge, dass lediglich eine der beiden *loxP*-Sequenzen und die *ADH-tHMG-TRP* Kasette in dem *URA3*-Genlocus enthalten bleibt. Die Folge ist, dass der Hefestamm die G418-Resistenz wieder verliert und damit geeignet ist, weitere Gene mittels dieses *cre-lox* Systems in den Hefestamm zu integrieren bzw. zu entfernen. Der Vektor pSH47 kann daraufhin durch eine Gegenselektion auf YNB-Agarplatten supplementiert mit Uracil (20 mg/L) und FOA (5-Fluoroorotic acid) (1g/L) wieder entfernt werden. Dazu müssen die Zellen, die dieses Plasmid tragen, zunächst unter nicht selektiven Bedingungen kultiviert werden und anschliessend auf FOA-haltigen Selektivplatten angezogen werden. Unter diesen Bedingungen können lediglich Zellen wachsen, die nicht in der Lage sind, Uracil selbst zu synthetisieren. Dies sind in diesem Fall Zellen, die kein Plasmid (pSH47) mehr enthalten.

Der Hefestamm GRF-*tH1ura3* und der Ausgangsstamm GRF wurden 48 Stunden lang in WMXIII-Medium bei 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 4 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikanekolben kultiviert.

- Die Sterole wurden nach der Methode wie in Parks LW, Bottema CD, Rodriguez RJ, Lewis TA. (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Methods Enzymol. 1985;111:333-46, beschrieben, nach 4 Tagen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Es ergeben sich die in Tabelle 1 aufgelisteten Werte. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf das Hefetrockengewicht.

Tabelle 1

Sterolgehalt [Peakfläche/gTS]	<i>S.cerevisiae</i> GRFtH1ura3	<i>S.cerevisiae</i> GRF
Squalen	9,93	0,1
Lanosterol	0,83	0,31
Zymosterol	1,18	1,07
Fecosterol	1,10	0,64
Episterol/Ergosta-5,7-dienol	1,04	0,72
Dimethyl- zymosterol	0,34	0,13

10

Beispiel 2

Expression von *ERG1* in *S. cerevisiae* GRFtH1ura3 bei gleichzeitiger Deletion von *ERG5*; Herstellung von GRFtH1ura3*ERG1**erg5*

15

Beispiel 2.1

Herstellung des Integrationsvektors pUG6-*ERG1*

20

Die DNA-Sequenz für die Kasette aus ADH-Promotor-*ERG1*-Tryptophan-Terminator wurde aus dem Vektor pFlat3-*ERG1* durch Restriktion mit den Enzymen *NheI* und *Bsp68I*(*NruI*) unter Verwendung von Standardmethoden isoliert. Das erhaltene DNA-Fragment wurde nach einer Klenow-Behandlung in den Vektor pUG6 in die *EcoRV*-Schnittstelle Blunt-end einkloniert und ergab den Vektor pUG6-*ERG1* (Abbildung 2)

25

Beispiel 2.2.

Integrative Transformationen

Nach Plasmidisolation wurde ein erweitertes Fragment aus dem Vektor pUG6-*ERG1* mittels PCR amplifiziert, so dass das resultierende Fragment aus folgenden Kompo-

nenten besteht: *loxP*-kanMX-*loxP*-*ADH1*-Pr.-*ERG1*-Trp-Term. Als Primer wurden Oligonucleotid-Sequenzen ausgewählt, die im annealenden Bereich die Sequenzen jenseits der zu amplifizierenden Kassette des Vektors pUG6-*ERG1* enthalten und an den 5' und 3' Überhängen je die 5' oder die 3' Sequenz des Integrationslocus *ERG5* enthalten. So ist gewährleistet, dass einerseits das gesamte Fragment inklusive *KanR* und Zielgen *ERG1* amplifiziert wird und andererseits dieses Fragment anschliessend in Hefe transformiert werden kann und durch homologe Rekombination in den Ziel-Genlocus *ERG5* der Hefe integriert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

10 *ERG5*-Crelox-5' (SEQ ID NO: 13): 5'-ATGAGTTCTG TCGCAGAAAA TATAATACAA CATGCCACTC CCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3' und

ERG5-Crelox-3' (SEQ ID NO: 14): 5'-TTATTCTGAAG ACTTCTCCAG TAATTGGGTC TCTCTTTTGG GCATAGGCCA CTAGTGGATC TG-3'

15 Als Selektionsmarker dient die Resistenz gegen Geneticin (G418). Der resultierende Stamm enthält eine Kopie des Zielgens *ERG1* unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors und des Tryptophan-Terminators. Gleichzeitig ist es möglich, durch die Integration des Gens das entsprechende Gen *ERG5* des Ziellocus zu deletieren. Um
20 die Resistenz gegen G418 anschliessend wieder zu entfernen, wird der entstandene Hefestamm mit dem *cre*-Rekombinase enthaltenden Vektor pSH47 transformiert. Durch diesen Vektor wird die *cre*-Rekombinase in der Hefe exprimiert, was zur Folge hat, dass der Sequenzbereich innerhalb der beiden *loxP*-Sequenzen heraus rekombiniert, was wiederum zur Folge hat, dass lediglich eine der beiden *loxP*-Sequenzen und
25 die Kassette aus *ADH1*-Prom.-*ERG1*-*TRP1*-Term. in dem Ziellocus *ERG5* enthalten bleiben. Die Folge ist, dass der Hefestamm eine G418 Resistenz wieder verliert. Der Vektor pSH47 kann daraufhin durch Anzucht auf FOA-Medium selektiv entfernt werden.

30 Der erhaltene Hefestamm GRFtH1ura3ERG1erg5 wurde für 48 Stunden lang in WMVII-Medium bei 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikankolben kultiviert.

35 Die Sterole wurden nach der Methode wie in Parks LW, Bottema CD, Rodriguez RJ, Lewis TA. (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Methods Enzymol. 1985;111:333-46, beschrieben, nach 4 Tagen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Es ergeben sich die in Tabelle 2 aufgelisteten

Werte. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf das Hefetrockengewicht.

Tabelle 2

Sterolgehalt [Peakfläche/gTS]	<i>S.cerevisiae</i> GRFtH1ura3ERG1erg5	<i>S.cerevisiae</i> GRF
Squalen	8,1	0,1
Lanosterol	2,42	0,31
Zymosterol	1,35	1,07
Fecosterol	2,01	0,64
Episterol/Ergosta-5,7- dienol	12,21	0,72
Dimethyl- zymosterol	1,02	0,13

5

Vergleichsbeispiel 1

Deletion von ERG5 in *S. cerevisiae* GRFtH1ura3; Herstellung von GRFtH1ura3erg5

- 10 Die Deletion von ERG5 in *S. cerevisiae* GRFtH1ura3 erfolgte analog wie in Beispiel 2 beschrieben. Um lediglich das ERG5-Gen zu deletieren, wurde das gleiche Verfahren verwendet, jedoch anstatt des Vektors pUG6-ERG1 der Vektor pUG6 eingesetzt. Dieser Vektor enthält keine Kassette aus ADH-Prom-ERG1-Trp-Term. Durch den Einsatz dieses Vektors ist es möglich eine Gen, in diesem Fall das Gen ERG5 zu
- 15 deletieren

- Der erhaltene Hefestamm GRFtH1ura3erg5 wurde für 48 Stunden lang in WMVII-Medium bei 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums
- 20 überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikankolben kultiviert.

- Die Sterole wurden nach der Methode wie in Parks LW, Bottema CD, Rodriguez RJ, Lewis TA. (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Methods Enzymol. 1985;111:333-46, beschrieben, nach 4 Tagen extrahiert und
- 25 mittels Gaschromatographie analysiert. Es ergeben sich die in Tabelle 3 aufgelisteten Werte. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf das Hefetrockengewicht.

Tabelle 3

Sterolgehalt [Peakfläche/g TS]	GRFtH1ura3ERG1erg5 (Beispiel 2)	GRFtH1ura3erg5 (Vergleichsbeispiel)
Squalen	8,1	13,18
Lanosterol	2,42	0,78
Zymosterol	1,35	0,10
Fecosterol	2,01	1,03
Episterol/Ergosta-5,7- dienol	12,21	8,98
4,4-Dimethylzymosterol	1,02	0,21

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen
5 die gegenüber dem Wildtyp
- eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und
- eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase Aktivität und
10 eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität und Squalensynthetase-Aktivität
- aufweisen.
15
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine $\Delta 22$ -Desaturase gegenüber dem Wildtyp reduziert.
20
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Organismus verwendet, der kein funktionelles $\Delta 22$ -Desaturase-Gen aufweist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
25
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase in den Organismus einbringt, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp, einer reduzierten Regulation unterliegt.
30
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt einen Promotor enthält, der in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp-Promotor, einer reduzierten Regulation unterliegt.
35
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit der Organismus eigenen, orthologen Nukleinsäure, einer reduzierten Regulation unterliegt.
40

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, die den katalytischen Bereich der HMG-CoA-Reduktase kodiert.
- 5 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4, und die die enzymatische Eigenschaft einer HMG-CoA-Reduktase aufweisen.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 3 einbringt.
- 15 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, in den Organismus einbringt.
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6, und die die enzymatische Eigenschaft einer Lanosterol-C14-Demethylase aufweisen.
- 30 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 5 einbringt.
- 35 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Squalenepoxidase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalenepoxidase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 40 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, in den Organismus einbringt.

- 5 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8, und die die enzymatische Eigenschaft einer Squalenepoxidase aufweisen.
- 10 18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 7 einbringt.
- 15 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Squalensynthetase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalensynthetase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase, in den Organismus einbringt.
- 25 21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 10 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 10, und die die enzymatische Eigenschaft einer Squalensynthetase aufweisen.
- 30 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 9 einbringt.
- 35 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass man als Organismus Hefe verwendet.
- 40 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren den Organismus erntet und anschließend Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetische Zwischen- und/oder Folgeprodukte aus dem Organismus isoliert.
25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung gegenüber dem Wildtyp
- die Δ^{22} -Desaturase-Aktivität reduziert und
- die HMG-CoA-Reduktase Aktivität erhöht und

mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität und Squalensynthetase-Aktivität erhöht.

5

26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch, wobei die genetische Veränderung gegenüber dem Wildtyp

die $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität reduziert und

10

die HMG-CoA-Reduktase Aktivität erhöht und

die Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität erhöht.

15

27. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aufweist.

20

28. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass man als Organismus Hefe verwendet:

29. Verwendung eines genetisch veränderten Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 27 zur Herstellung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten.

25

30. Verfahren zur Herstellung eines genetisch veränderten Organismus indem man ausgehend von einem Ausgangsorganismus

30

die $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität reduziert und

die HMG-CoA-Reduktase Aktivität erhöht und

35

mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität und Squalensynthetase-Aktivität erhöht.

10/549871

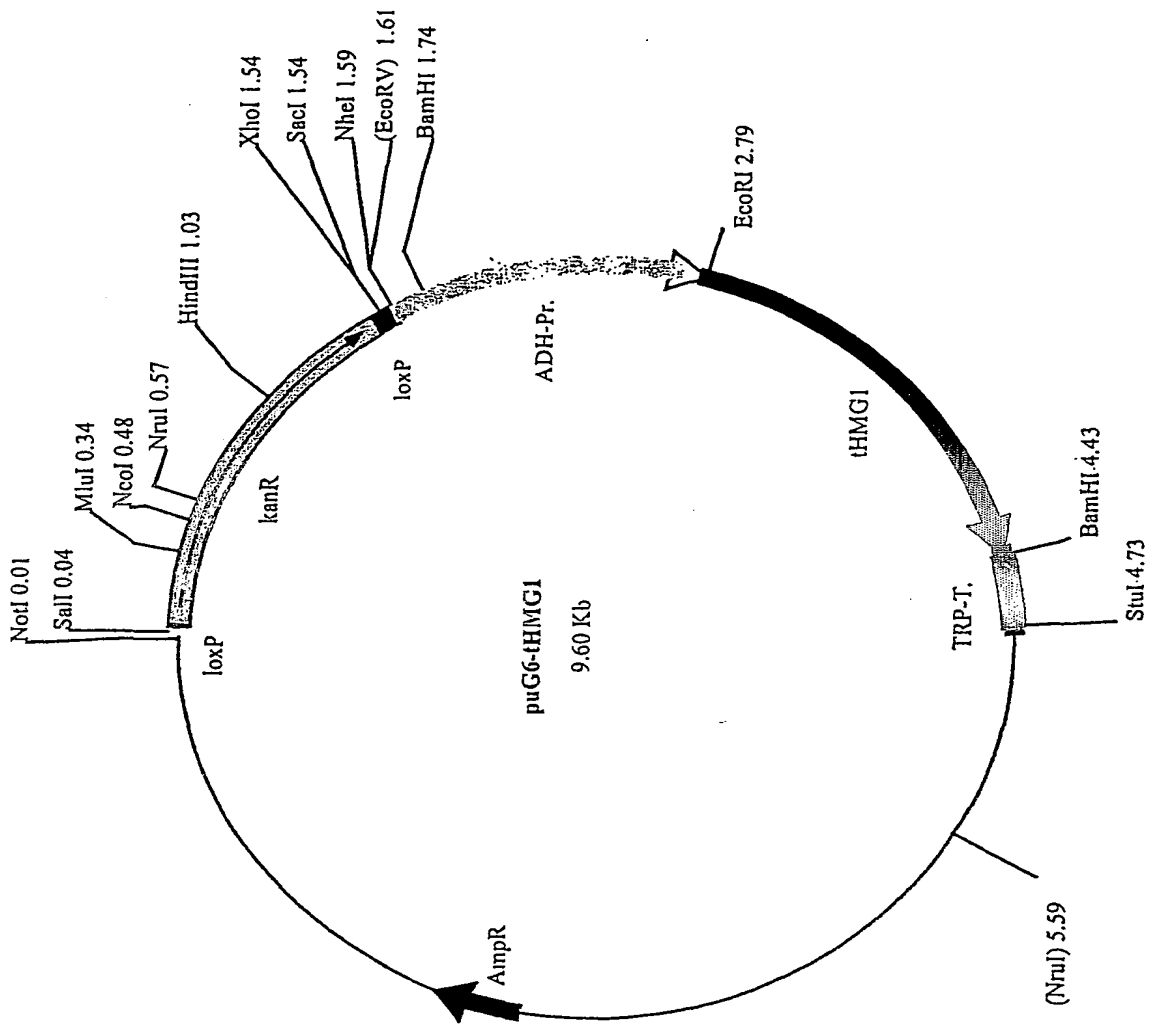


Abbildung 1

J017 Rec'd PCT/PTO 13 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

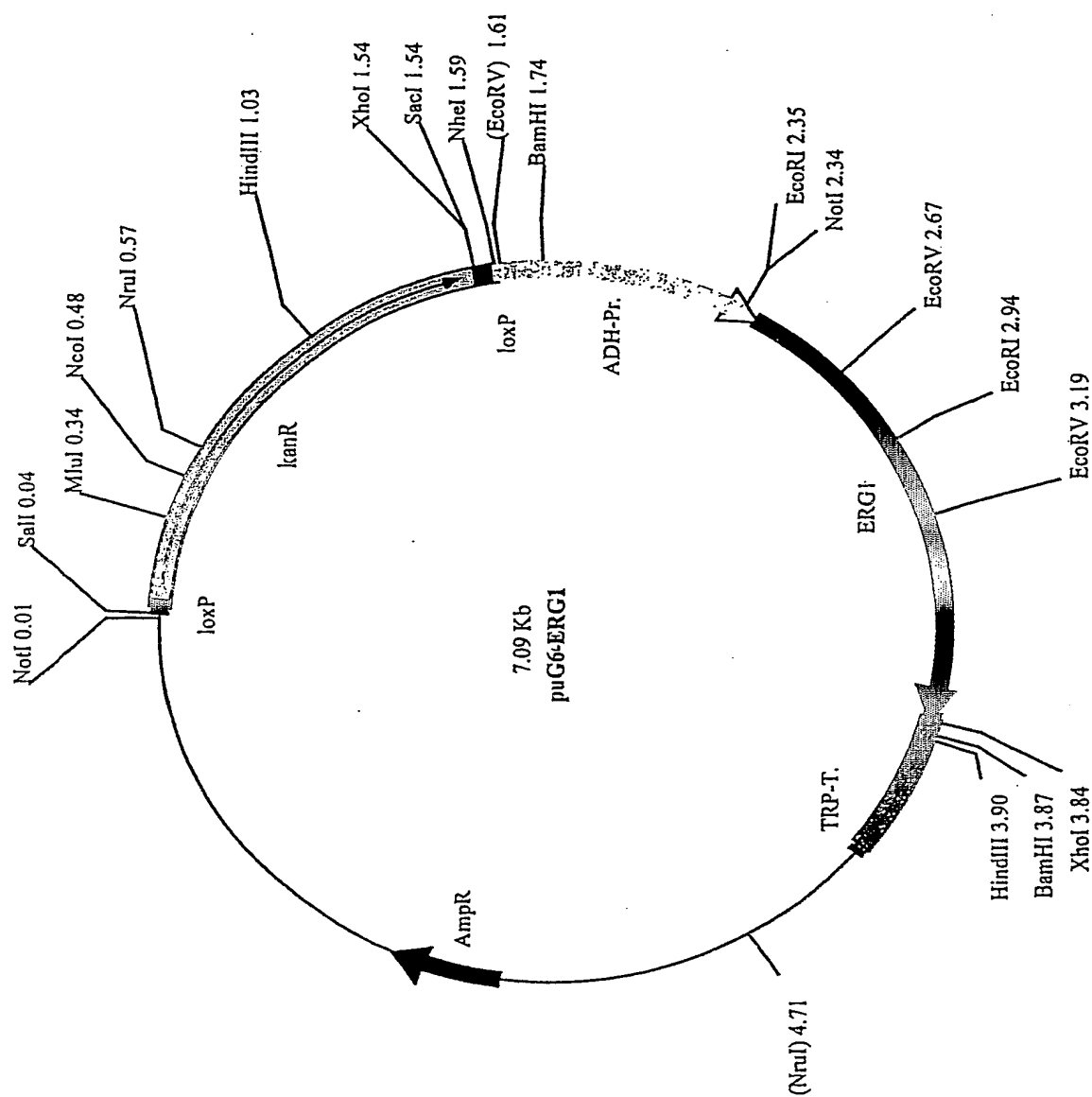


Abbildung 2

JC17 Rec'd PCT/PTO 18 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Verfahren zur Herstellung von Ergosta-5,7-dienol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten in transgenen Organismen

<130> 20020748

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1617

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1617)

<223>

<400> 1

atg agt tct gtc gca gaa aat ata ata caa cat gcc act cat aat tct
Met Ser Ser Val Ala Glu Asn Ile Ile Gln His Ala Thr His Asn Ser

48

2

1	5	10	15	
acg cta cac caa ttg gct aaa gac cag ccc tct gta ggc gtc act act				96
Thr Leu His Gln Leu Ala Lys Asp Gln Pro Ser Val Gly Val Thr Thr				
20	25	30		
gcc ttc agt atc ctg gat aca ctt aag tct atg tca tat ttg aaa ata				144
Ala Phe Ser Ile Leu Asp Thr Leu Lys Ser Met Ser Tyr Leu Lys Ile				
35	40	45		
ttt gct act tta atc tgt att ctt ttg gtt tgg gac caa gtt gca tat				192
Phe Ala Thr Leu Ile Cys Ile Leu Leu Val Trp Asp Gln Val Ala Tyr				
50	55	60		
caa atc aag aaa ggt tcc atc gca ggt cca aag ttt aag ttc tgg ccc				240
Gln Ile Lys Lys Gly Ser Ile Ala Gly Pro Lys Phe Lys Phe Trp Pro				
65	70	75	80	
atc atc ggt cca ttt ttg gaa tcc tta gat cca aag ttt gaa gaa tat				288
Ile Ile Gly Pro Phe Leu Glu Ser Leu Asp Pro Lys Phe Glu Glu Tyr				
85	90	95		
aag gct aag tgg gca tcc ggt cca ctt tca tgt gtt tct att ttc cat				336
Lys Ala Lys Trp Ala Ser Gly Pro Leu Ser Cys Val Ser Ile Phe His				
100	105	110		
aaa ttt gtt gtt atc gca tct act aga gac ttg gca aga aag atc ttg				384
Lys Phe Val Val Ile Ala Ser Thr Arg Asp Leu Ala Arg Lys Ile Leu				
115	120	125		
caa tct tcc aaa ttc gtc aaa cct tgc gtt gtc gat gtt gct gtg aag				432
Gln Ser Ser Lys Phe Val Lys Pro Cys Val Val Asp Val Ala Val Lys				
130	135	140		
atc tta aga cct tgc aat tgg gtt ttt ttg gac ggt aaa gct cat act				480
Ile Leu Arg Pro Cys Asn Trp Val Phe Leu Asp Gly Lys Ala His Thr				
145	150	155	160	
gat tac aga aaa tca tta aac ggt ctt ttc act aaa caa gct ttg gct				528
Asp Tyr Arg Lys Ser Leu Asn Gly Leu Phe Thr Lys Gln Ala Leu Ala				
165	170	175		
caa tac tta cct tca ttg gaa caa atc atg gat aag tac atg gat aag				576
Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Glu Gln Ile Met Asp Lys Tyr Met Asp Lys				
180	185	190		
ttt gtt cgt tta tct aag gag aat aac tac gag ccc cag gtc ttt ttc				624
Phe Val Arg Leu Ser Lys Glu Asn Asn Tyr Glu Pro Gln Val Phe Phe				

195	200	205	
cat gaa atg aga gaa att ctt tgc gcc tta tca ttg aac tct ttc tgt			672
His Glu Met Arg Glu Ile Leu Cys Ala Leu Ser Leu Asn Ser Phe Cys			
210	215	220	
ggt aac tat att acc gaa gat caa gtc aga aag att gct gat gat tac			720
Gly Asn Tyr Ile Thr Glu Asp Gln Val Arg Lys Ile Ala Asp Asp Tyr			
225	230	235	240
tat ttg gtt aca gca gca ttg gaa tta gtc aac ttc cca att att atc			768
Tyr Leu Val Thr Ala Ala Leu Glu Leu Val Asn Phe Pro Ile Ile Ile			
	245	250	255
cct tac act aaa aca tgg tat ggt aag aaa act gca gac atg gcc atg			816
Pro Tyr Thr Lys Thr Trp Tyr Gly Lys Lys Thr Ala Asp Met Ala Met			
	260	265	270
aag att ttc gaa aac tgt gct caa atg gct aag gat cat att gct gca			864
Lys Ile Phe Glu Asn Cys Ala Gln Met Ala Lys Asp His Ile Ala Ala			
	275	280	285
ggt ggt aag cca gtt tgt gtt atg gat gct tgg tgt aag ttg atg cac			912
Gly Gly Lys Pro Val Cys Val Met Asp Ala Trp Cys Lys Leu Met His			
	290	295	300
gat gca aag aat agt aac gat gat gat tct aga atc tac cac aga gag			960
Asp Ala Lys Asn Ser Asn Asp Asp Asp Ser Arg Ile Tyr His Arg Glu			
305	310	315	320
ttt act aac aag gaa atc tcc gaa gct gtt ttc act ttc tta ttt gct			1008
Phe Thr Asn Lys Glu Ile Ser Glu Ala Val Phe Thr Phe Leu Phe Ala			
	325	330	335
tct caa gat gcc tct tct tct tta gct tgt tgg ttg ttc caa att gtt			1056
Ser Gln Asp Ala Ser Ser Ser Leu Ala Cys Trp Leu Phe Gln Ile Val			
	340	345	350
gct gac cgt cca gat gtc tta gct aag atc aga gaa gaa caa ttg gct			1104
Ala Asp Arg Pro Asp Val Leu Ala Lys Ile Arg Glu Glu Gln Leu Ala			
	355	360	365
gtt cgt aac aat gac atg tct acc gaa ttg aac ttg gat ttg att gag			1152
Val Arg Asn Asn Asp Met Ser Thr Glu Leu Asn Leu Asp Leu Ile Glu			
	370	375	380
aaa atg aag tac acc aat atg gtc ata aaa gaa act ttg cgt tac aga			1200
Lys Met Lys Tyr Thr Asn Met Val Ile Lys Glu Thr Leu Arg Tyr Arg			

4

385	390	395	400	
cct cct gtc ttg atg gtt cca tat gtt gtt aag aag aat ttc cca gtt				1248
Pro Pro Val Leu Met Val Pro Tyr Val Val Lys Lys Asn Phe Pro Val				
	405	410	415	
tcc cct aac tat acc gca cca aag ggc gct atg tta att cca acc tta				1296
Ser Pro Asn Tyr Thr Ala Pro Lys Gly Ala Met Leu Ile Pro Thr Leu				
	420	425	430	
tac cca gct tta cat gat cct gaa gtt tac gaa aat cct gat gag ttc				1344
Tyr Pro Ala Leu His Asp Pro Glu Val Tyr Glu Asn Pro Asp Glu Phe				
	435	440	445	
atc cct gaa aga tgg gta gaa ggc tct aag gct agt gaa gca aag aag				1392
Ile Pro Glu Arg Trp Val Glu Gly Ser Lys Ala Ser Glu Ala Lys Lys				
	450	455	460	
aat tgg ttg gtt ttt ggt tgt ggt cca cac gtt tgc tta ggt caa aca				1440
Asn Trp Leu Val Phe Gly Cys Gly Pro His Val Cys Leu Gly Gln Thr				
	465	470	475	480
tat gtc atg att acc ttc gcc gct ttg ttg ggt aaa ttt gca cta tat				1488
Tyr Val Met Ile Thr Phe Ala Ala Leu Leu Gly Lys Phe Ala Leu Tyr				
	485	490	495	
act gat ttc cat cat aca gtg act cca tta agt gaa aaa atc aag gtt				1536
Thr Asp Phe His His Thr Val Thr Pro Leu Ser Glu Lys Ile Lys Val				
	500	505	510	
ttc gct aca att ttc cca aaa gat gat ttg tta ctg act ttc aaa aag				1584
Phe Ala Thr Ile Phe Pro Lys Asp Asp Leu Leu Leu Thr Phe Lys Lys				
	515	520	525	
aga gac cca att act gga gaa gtc ttc gaa taa				1617
Arg Asp Pro Ile Thr Gly Glu Val Phe Glu				
	530	535		

<210> 2

<211> 538

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

Met Ser Ser Val Ala Glu Asn Ile Ile Gln His Ala Thr His Asn Ser
1 5 10 15

Thr Leu His Gln Leu Ala Lys Asp Gln Pro Ser Val Gly Val Thr Thr
20 25 30

Ala Phe Ser Ile Leu Asp Thr Leu Lys Ser Met Ser Tyr Leu Lys Ile
35 40 45

Phe Ala Thr Leu Ile Cys Ile Leu Leu Val Trp Asp Gln Val Ala Tyr
50 55 60

Gln Ile Lys Lys Gly Ser Ile Ala Gly Pro Lys Phe Lys Phe Trp Pro
65 70 75 80

Ile Ile Gly Pro Phe Leu Glu Ser Leu Asp Pro Lys Phe Glu Glu Tyr
85 90 95

Lys Ala Lys Trp Ala Ser Gly Pro Leu Ser Cys Val Ser Ile Phe His
100 105 110

Lys Phe Val Val Ile Ala Ser Thr Arg Asp Leu Ala Arg Lys Ile Leu
115 120 125

Gln Ser Ser Lys Phe Val Lys Pro Cys Val Val Asp Val Ala Val Lys
130 135 140

Ile Leu Arg Pro Cys Asn Trp Val Phe Leu Asp Gly Lys Ala His Thr
145 150 155 160

Asp Tyr Arg Lys Ser Leu Asn Gly Leu Phe Thr Lys Gln Ala Leu Ala
165 170 175

6

Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Glu Gln Ile Met Asp Lys Tyr Met Asp Lys
180 185 190

Phe Val Arg Leu Ser Lys Glu Asn Asn Tyr Glu Pro Gln Val Phe Phe
195 200 205

His Glu Met Arg Glu Ile Leu Cys Ala Leu Ser Leu Asn Ser Phe Cys
210 215 220

Gly Asn Tyr Ile Thr Glu Asp Gln Val Arg Lys Ile Ala Asp Asp Tyr
225 230 235 240

Tyr Leu Val Thr Ala Ala Leu Glu Leu Val Asn Phe Pro Ile Ile Ile
245 250 255

Pro Tyr Thr Lys Thr Trp Tyr Gly Lys Lys Thr Ala Asp Met Ala Met
260 265 270

Lys Ile Phe Glu Asn Cys Ala Gln Met Ala Lys Asp His Ile Ala Ala
275 280 285

Gly Gly Lys Pro Val Cys Val Met Asp Ala Trp Cys Lys Leu Met His
290 295 300

Asp Ala Lys Asn Ser Asn Asp Asp Asp Ser Arg Ile Tyr His Arg Glu
305 310 315 320

Phe Thr Asn Lys Glu Ile Ser Glu Ala Val Phe Thr Phe Leu Phe Ala
325 330 335

Ser Gln Asp Ala Ser Ser Ser Leu Ala Cys Trp Leu Phe Gln Ile Val
340 345 350

Ala Asp Arg Pro Asp Val Leu Ala Lys Ile Arg Glu Glu Gln Leu Ala
355 360 365

7

Val Arg Asn Asn Asp Met Ser Thr Glu Leu Asn Leu Asp Leu Ile Glu
370 375 380

Lys Met Lys Tyr Thr Asn Met Val Ile Lys Glu Thr Leu Arg Tyr Arg
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Met Val Pro Tyr Val Val Lys Lys Asn Phe Pro Val
405 410 415

Ser Pro Asn Tyr Thr Ala Pro Lys Gly Ala Met Leu Ile Pro Thr Leu
420 425 430

Tyr Pro Ala Leu His Asp Pro Glu Val Tyr Glu Asn Pro Asp Glu Phe
435 440 445

Ile Pro Glu Arg Trp Val Glu Gly Ser Lys Ala Ser Glu Ala Lys Lys
450 455 460

Asn Trp Leu Val Phe Gly Cys Gly Pro His Val Cys Leu Gly Gln Thr
465 470 475 480

Tyr Val Met Ile Thr Phe Ala Ala Leu Leu Gly Lys Phe Ala Leu Tyr
485 490 495

Thr Asp Phe His His Thr Val Thr Pro Leu Ser Glu Lys Ile Lys Val
500 505 510

Phe Ala Thr Ile Phe Pro Lys Asp Asp Leu Leu Leu Thr Phe Lys Lys
515 520 525

Arg Asp Pro Ile Thr Gly Glu Val Phe Glu
530 535

<210> 3

<211> 1578

gaa gct cct gta tta gca tct gat cgt tta cca tat aaa aat tat gac	432
Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Asp	
130 135 140	
tac gac cgc gta ttt ggc gct tgt tgt gaa aat gtt ata ggt tac atg	480
Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr Met	
145 150 155 160	
cct ttg ccc gtt ggt gtt ata ggc ccc ttg gtt atc gat ggt aca tct	528
Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr Ser	
165 170 175	
tat cat ata cca atg gca act aca gag ggt tgt ttg gta gct tct gcc	576
Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Ala	
180 185 190	
atg cgt ggc tgt aag gca atc aat gct ggc ggt ggt gca aca act gtt	624
Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr Val	
195 200 205	
tta act aag gat ggt atg aca aga ggc cca gta gtc cgt ttc cca act	672
Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro Thr	
210 215 220	
ttg aaa aga tct ggt gcc tgt aag ata tgg tta gac tca gaa gag gga	720
Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu Gly	
225 230 235 240	
caa aac gca att aaa aaa gct ttt aac tct aca tca aga ttt gca cgt	768
Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala Arg	
245 250 255	
ctg caa cat att caa act tgt cta gca gga gat tta ctc ttc atg aga	816
Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met Arg	
260 265 270	
ttt aga aca act act ggt gac gca atg ggt atg aat atg att tct aaa	864
Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser Lys	
275 280 285	
ggg gtc gaa tac tca tta aag caa atg gta gaa gag tat ggc tgg gaa	912
Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp Glu	
290 295 300	
gat atg gag gtt gtc tcc gtt tct ggt aac tac tgt acc gac aaa aaa	960
Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys Lys	
305 310 315 320	

cca gct gcc atc aac tgg atc gaa ggt cgt ggt aag agt gtc gtc gca	1008
Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Ala	
325 330 335	
gaa gct act att cct ggt gat gtt gtc aga aaa gtg tta aaa agt gat	1056
Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser Asp	
340 345 350	
gtt tcc gca ttg gtt gag ttg aac att gct aag aat ttg gtt gga tct	1104
Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly Ser	
355 360 365	
gca atg gct ggg tct gtt ggt gga ttt aac gca cat gca gct aat tta	1152
Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn Leu	
370 375 380	
gtg aca gct gtt ttc ttg gca tta gga caa gat cct gca caa aat gtt	1200
Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val	
385 390 395 400	
gaa agt tcc aac tgt ata aca ttg atg aaa gaa gtg gac ggt gat ttg	1248
Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp Leu	
405 410 415	
aga att tcc gta tcc atg cca tcc atc gaa gta ggt acc atc ggt ggt	1296
Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly Gly	
420 425 430	
ggt act gtt cta gaa cca caa ggt gcc atg ttg gac tta tta ggt gta	1344
Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly Val	
435 440 445	
aga ggc ccg cat gct acc gct cct ggt acc aac gca cgt caa tta gca	1392
Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu Ala	
450 455 460	
aga ata gtt gcc tgt gcc gtc ttg gca ggt gaa tta tcc tta tgt gct	1440
Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys Ala	
465 470 475 480	
gcc cta gca gcc ggc cat ttg gtt caa agt cat atg acc cac aac agg	1488
Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn Arg	
485 490 495	
aaa cct gct gaa cca aca aaa cct aac aat ttg gac gcc act gat ata	1536
Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp Ile	
500 505 510	

aat cgt ttg aaa gat ggg tcc gtc acc tgc att aaa tcc taa 1578
Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
515 520 525

<210> 4

<211> 525

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 4

Met	Asp	Gln	Leu	Val	Lys	Thr	Glu	Val	Thr	Lys	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala
1				5					10					15	

Pro	Val	Gln	Lys	Ala	Ser	Thr	Pro	Val	Leu	Thr	Asn	Lys	Thr	Val	Ile
			20					25					30		

Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser Ser
35 40 45

Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu Ser
50 55 60

Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu Val
85 90 95

Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly Asp
100 105 110

Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu Ala
115 120 125

Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Asp
130 135 140

Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr Met
145 150 155 160

Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr Ser
165 170 175

Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Ala
180 185 190

Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr Val
195 200 205

Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro Thr
210 215 220

Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu Gly
225 230 235 240

Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala Arg
245 250 255

Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met Arg
260 265 270

Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser Lys
275 280 285

Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp Glu
290 295 300

Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys Lys
305 310 315 320

Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Ala
325 330 335

Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser Asp
340 345 350

Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly Ser
355 360 365

Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn Leu
370 375 380

Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val
385 390 395 400

Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp Leu
405 410 415

Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly Gly
420 425 430

Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly Val
435 440 445

Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu Ala
450 455 460

Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys Ala
465 470 475 480

Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn Arg
485 490 495

Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp Ile
500 505 510

Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
 515 520 525

<210> 5

<211> 1593

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1593)

<223>

<400> 5

atg tct gct acc aag tca atc gtt gga gag gca ttg gaa tac gta aac	48
Met Ser Ala Thr Lys Ser Ile Val Gly Glu Ala Leu Glu Tyr Val Asn	
1 5 10 15	
att ggt tta agt cat ttc ttg gct tta cca ttg gcc caa aga atc tct	96
Ile Gly Leu Ser His Phe Leu Ala Leu Pro Leu Ala Gln Arg Ile Ser	
20 25 30	
ttg atc ata ata att cct ttc att tac aat att gta tgg caa tta cta	144
Leu Ile Ile Ile Ile Pro Phe Ile Tyr Asn Ile Val Trp Gln Leu Leu	
35 40 45	
tat tct ttg aga aag gac cgt cca cct cta gtg ttt tac tgg att cca	192
Tyr Ser Leu Arg Lys Asp Arg Pro Pro Leu Val Phe Tyr Trp Ile Pro	
50 55 60	
tgg gtc ggt agt gct gtt gtg tac ggt atg aag cca tac gag ttt ttc	240
Trp Val Gly Ser Ala Val Val Tyr Gly Met Lys Pro Tyr Glu Phe Phe	
65 70 75 80	
gaa gaa tgt caa aag aaa tac ggt gat att ttt tca ttc gtt ttg tta	288

15

Glu Glu Cys Gln Lys Lys Tyr Gly Asp Ile Phe Ser Phe Val Leu Leu	
85 90 95	
gga aga gtc atg act gtg tat tta gga cca aag ggt cac gaa ttt gtc	336
Gly Arg Val Met Thr Val Tyr Leu Gly Pro Lys Gly His Glu Phe Val	
100 105 110	
ttc aac gct aag ttg gca gat gtt tca gca gaa gct gct tac gct cat	384
Phe Asn Ala Lys Leu Ala Asp Val Ser Ala Glu Ala Ala Tyr Ala His	
115 120 125	
ttg act act cca gtt ttc ggt aaa ggt gtt att tac gat tgt cca aat	432
Leu Thr Thr Pro Val Phe Gly Lys Gly Val Ile Tyr Asp Cys Pro Asn	
130 135 140	
tct aga ttg atg gag caa aag aag ttt gtt aag ggt gct cta acc aaa	480
Ser Arg Leu Met Glu Gln Lys Lys Phe Val Lys Gly Ala Leu Thr Lys	
145 150 155 160	
gaa gcc ttc aag agc tac gtt cca ttg att gct gaa gaa gtg tac aag	528
Glu Ala Phe Lys Ser Tyr Val Pro Leu Ile Ala Glu Glu Val Tyr Lys	
165 170 175	
tac ttc aga gac tcc aaa aac ttc cgt ttg aat gaa aga act act ggt	576
Tyr Phe Arg Asp Ser Lys Asn Phe Arg Leu Asn Glu Arg Thr Thr Gly	
180 185 190	
act att gac gtg atg gtt act caa cct gaa atg act att ttc acc gct	624
Thr Ile Asp Val Met Val Thr Gln Pro Glu Met Thr Ile Phe Thr Ala	
195 200 205	
tca aga tca tta ttg ggt aag gaa atg aga gca aaa ttg gat acc gat	672
Ser Arg Ser Leu Leu Gly Lys Glu Met Arg Ala Lys Leu Asp Thr Asp	
210 215 220	
ttt gct tac ttg tac agt gat ttg gat aag ggt ttc act cca atc aac	720
Phe Ala Tyr Leu Tyr Ser Asp Leu Asp Lys Gly Phe Thr Pro Ile Asn	
225 230 235 240	
ttc gtc ttc cct aac tta cca ttg gaa cac tat aga aag aga gat cac	768
Phe Val Phe Pro Asn Leu Pro Leu Glu His Tyr Arg Lys Arg Asp His	
245 250 255	
gct caa aag gct atc tcc ggt act tac atg tct ttg att aag gaa aga	816
Ala Gln Lys Ala Ile Ser Gly Thr Tyr Met Ser Leu Ile Lys Glu Arg	
260 265 270	
aga aag aac aac gac att caa gac aga gat ttg atc gat tcc ttg atg	864

16

Arg	Lys	Asn	Asn	Asp	Ile	Gln	Asp	Arg	Asp	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	Met	
		275					280					285				
aag	aac	tct	acc	tac	aag	gat	ggg	gtg	aag	atg	act	gat	caa	gaa	atc	912
Lys	Asn	Ser	Thr	Tyr	Lys	Asp	Gly	Val	Lys	Met	Thr	Asp	Gln	Glu	Ile	
		290				295				300						
gct	aac	ttg	tta	att	ggg	gtc	tta	atg	ggg	ggg	caa	cat	act	tct	gct	960
Ala	Asn	Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Leu	Met	Gly	Gly	Gln	His	Thr	Ser	Ala	
305					310				315					320		
gcc	act	tct	gct	tgg	att	ttg	ttg	cac	ttg	gct	gaa	aga	cca	gat	gtc	1008
Ala	Thr	Ser	Ala	Trp	Ile	Leu	Leu	His	Leu	Ala	Glu	Arg	Pro	Asp	Val	
			325					330					335			
caa	caa	gaa	ttg	tac	gaa	gaa	caa	atg	cgt	gtt	ttg	gat	ggg	ggg	aag	1056
Gln	Gln	Glu	Leu	Tyr	Glu	Glu	Gln	Met	Arg	Val	Leu	Asp	Gly	Gly	Lys	
		340					345					350				
aag	gaa	ttg	acc	tac	gat	tta	tta	caa	gaa	atg	cca	ttg	ttg	aac	caa	1104
Lys	Glu	Leu	Thr	Tyr	Asp	Leu	Leu	Gln	Glu	Met	Pro	Leu	Leu	Asn	Gln	
		355				360						365				
act	att	aag	gaa	act	cta	aga	atg	cac	cat	cca	ttg	cac	tct	ttg	ttc	1152
Thr	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Met	His	His	Pro	Leu	His	Ser	Leu	Phe	
		370				375					380					
cgt	aag	gtt	atg	aaa	gat	atg	cac	gtt	cca	aac	act	tct	tat	gtc	atc	1200
Arg	Lys	Val	Met	Lys	Asp	Met	His	Val	Pro	Asn	Thr	Ser	Tyr	Val	Ile	
385					390				395					400		
cca	gca	ggg	tat	cac	gtt	ttg	gtt	tct	cca	ggg	tac	act	cat	tta	aga	1248
Pro	Ala	Gly	Tyr	His	Val	Leu	Val	Ser	Pro	Gly	Tyr	Thr	His	Leu	Arg	
			405					410					415			
gac	gaa	tac	ttc	cct	aat	gct	cac	caa	ttc	aac	att	cac	cgt	tgg	aac	1296
Asp	Glu	Tyr	Phe	Pro	Asn	Ala	His	Gln	Phe	Asn	Ile	His	Arg	Trp	Asn	
			420					425					430			
aaa	gat	tct	gcc	tcc	tct	tat	tcc	gtc	ggg	gaa	gaa	gtc	gat	tac	ggg	1344
Lys	Asp	Ser	Ala	Ser	Ser	Tyr	Ser	Val	Gly	Glu	Glu	Val	Asp	Tyr	Gly	
		435					440					445				
ttc	ggg	gcc	att	tct	aag	ggg	gtc	agc	tct	cca	tac	tta	cct	ttc	ggg	1392
Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	Lys	Gly	Val	Ser	Ser	Pro	Tyr	Leu	Pro	Phe	Gly	
		450				455					460					
ggg	ggg	aga	cac	aga	tgt	atc	ggg	gaa	cac	ttt	gct	tac	tgt	cag	cta	1440

17

Gly Gly Arg His Arg Cys Ile Gly Glu His Phe Ala Tyr Cys Gln Leu
 465 470 475 480

ggt gtt cta atg tcc att ttt atc aga aca tta aaa tgg cat tac cca 1488
 Gly Val Leu Met Ser Ile Phe Ile Arg Thr Leu Lys Trp His Tyr Pro
 485 490 495

gag ggt aag acc gtt cca cct cct gac ttt aca tct atg gtt act ctt 1536
 Glu Gly Lys Thr Val Pro Pro Pro Asp Phe Thr Ser Met Val Thr Leu
 500 505 510

cca acc ggt cca gcc aag atc atc tgg gaa aag aga aat cca gaa caa 1584
 Pro Thr Gly Pro Ala Lys Ile Ile Trp Glu Lys Arg Asn Pro Glu Gln
 515 520 525

aag atc taa 1593
 Lys Ile
 530

<210> 6

<211> 530

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*.

<400> 6

Met Ser Ala Thr Lys Ser Ile Val Gly Glu Ala Leu Glu Tyr Val Asn
 1 5 10 15

Ile Gly Leu Ser His Phe Leu Ala Leu Pro Leu Ala Gln Arg Ile Ser
 20 25 30

Leu Ile Ile Ile Ile Pro Phe Ile Tyr Asn Ile Val Trp Gln Leu Leu
 35 40 45

Tyr Ser Leu Arg Lys Asp Arg Pro Pro Leu Val Phe Tyr Trp Ile Pro
 50 55 60

18

Trp Val Gly Ser Ala Val Val Tyr Gly Met Lys Pro Tyr Glu Phe Phe
65 70 75 80

Glu Glu Cys Gln Lys Lys Tyr Gly Asp Ile Phe Ser Phe Val Leu Leu
85 90 95

Gly Arg Val Met Thr Val Tyr Leu Gly Pro Lys Gly His Glu Phe Val
100 105 110

Phe Asn Ala Lys Leu Ala Asp Val Ser Ala Glu Ala Ala Tyr Ala His
115 120 125

Leu Thr Thr Pro Val Phe Gly Lys Gly Val Ile Tyr Asp Cys Pro Asn
130 135 140

Ser Arg Leu Met Glu Gln Lys Lys Phe Val Lys Gly Ala Leu Thr Lys
145 150 155 160

Glu Ala Phe Lys Ser Tyr Val Pro Leu Ile Ala Glu Glu Val Tyr Lys
165 170 175

Tyr Phe Arg Asp Ser Lys Asn Phe Arg Leu Asn Glu Arg Thr Thr Gly
180 185 190

Thr Ile Asp Val Met Val Thr Gln Pro Glu Met Thr Ile Phe Thr Ala
195 200 205

Ser Arg Ser Leu Leu Gly Lys Glu Met Arg Ala Lys Leu Asp Thr Asp
210 215 220

Phe Ala Tyr Leu Tyr Ser Asp Leu Asp Lys Gly Phe Thr Pro Ile Asn
225 230 235 240

Phe Val Phe Pro Asn Leu Pro Leu Glu His Tyr Arg Lys Arg Asp His
245 250 255

19

Ala Gln Lys Ala Ile Ser Gly Thr Tyr Met Ser Leu Ile Lys Glu Arg
260 265 270

Arg Lys Asn Asn Asp Ile Gln Asp Arg Asp Leu Ile Asp Ser Leu Met
275 280 285

Lys Asn Ser Thr Tyr Lys Asp Gly Val Lys Met Thr Asp Gln Glu Ile
290 295 300

Ala Asn Leu Leu Ile Gly Val Leu Met Gly Gly Gln His Thr Ser Ala
305 310 315 320

Ala Thr Ser Ala Trp Ile Leu Leu His Leu Ala Glu Arg Pro Asp Val
325 330 335

Gln Gln Glu Leu Tyr Glu Glu Gln Met Arg Val Leu Asp Gly Gly Lys
340 345 350

Lys Glu Leu Thr Tyr Asp Leu Leu Gln Glu Met Pro Leu Leu Asn Gln
355 360 365

Thr Ile Lys Glu Thr Leu Arg Met His His Pro Leu His Ser Leu Phe
370 375 380

Arg Lys Val Met Lys Asp Met His Val Pro Asn Thr Ser Tyr Val Ile
385 390 395 400

Pro Ala Gly Tyr His Val Leu Val Ser Pro Gly Tyr Thr His Leu Arg
405 410 415

Asp Glu Tyr Phe Pro Asn Ala His Gln Phe Asn Ile His Arg Trp Asn
420 425 430

Lys Asp Ser Ala Ser Ser Tyr Ser Val Gly Glu Glu Val Asp Tyr Gly
435 440 445

20

Phe Gly Ala Ile Ser Lys Gly Val Ser Ser Pro Tyr Leu Pro Phe Gly
 450 455 460

Gly Gly Arg His Arg Cys Ile Gly Glu His Phe Ala Tyr Cys Gln Leu
 465 470 475 480

Gly Val Leu Met Ser Ile Phe Ile Arg Thr Leu Lys Trp His Tyr Pro
 485 490 495

Glu Gly Lys Thr Val Pro Pro Pro Asp Phe Thr Ser Met Val Thr Leu
 500 505 510

Pro Thr Gly Pro Ala Lys Ile Ile Trp Glu Lys Arg Asn Pro Glu Gln
 515 520 525

Lys Ile
 530

<210> 7

<211> 1491

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1491)

<223>

<400> 7

atg tct gct gtt aac gtt gca cct gaa ttg att aat gcc gac aac aca
 Met Ser Ala Val Asn Val Ala Pro Glu Leu Ile Asn Ala Asp Asn Thr
 1 5 10 15

48

att acc tac gat gcg att gtc atc ggt gct ggt gtt atc ggt cca tgt	96
Ile Thr Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ala Gly Val Ile Gly Pro Cys	
20 25 30	
ggt gct act ggt cta gca aga aag ggt aag aaa gtt ctt atc gta gaa	144
Val Ala Thr Gly Leu Ala Arg Lys Gly Lys Lys Val Leu Ile Val Glu	
35 40 45	
cgt gac tgg gct atg cct gat aga att gtt ggt gaa ttg atg caa cca	192
Arg Asp Trp Ala Met Pro Asp Arg Ile Val Gly Glu Leu Met Gln Pro	
50 55 60	
ggt ggt gtt aga gca ttg aga agt ctg ggt atg att caa tct atc aac	240
Gly Gly Val Arg Ala Leu Arg Ser Leu Gly Met Ile Gln Ser Ile Asn	
65 70 75 80	
aac atc gaa gca tat cct gtt acc ggt tat acc gtc ttt ttc aac ggc	288
Asn Ile Glu Ala Tyr Pro Val Thr Gly Tyr Thr Val Phe Phe Asn Gly	
85 90 95	
gaa caa gtt gat att cca tac cct tac aag gcc gat atc cct aaa gtt	336
Glu Gln Val Asp Ile Pro Tyr Pro Tyr Lys Ala Asp Ile Pro Lys Val	
100 105 110	
gaa aaa ttg aag gac ttg gtc aaa gat ggt aat gac aag gtc ttg gaa	384
Glu Lys Leu Lys Asp Leu Val Lys Asp Gly Asn Asp Lys Val Leu Glu	
115 120 125	
gac agc act att cac atc aag gat tac gaa gat gat gaa aga gaa agg	432
Asp Ser Thr Ile His Ile Lys Asp Tyr Glu Asp Asp Glu Arg Glu Arg	
130 135 140	
ggt gtt gct ttt gtt cat ggt aga ttc ttg aac aac ttg aga aac att	480
Gly Val Ala Phe Val His Gly Arg Phe Leu Asn Asn Leu Arg Asn Ile	
145 150 155 160	
act gct caa gag cca aat gtt act aga gtg caa ggt aac tgt att gag	528
Thr Ala Gln Glu Pro Asn Val Thr Arg Val Gln Gly Asn Cys Ile Glu	
165 170 175	
ata ttg aag gat gaa aag aat gag gtt gtt ggt gcc aag gtt gac att	576
Ile Leu Lys Asp Glu Lys Asn Glu Val Val Gly Ala Lys Val Asp Ile	
180 185 190	
gat ggc cgt ggc aag gtg gaa ttc aaa gcc cac ttg aca ttt atc tgt	624
Asp Gly Arg Gly Lys Val Glu Phe Lys Ala His Leu Thr Phe Ile Cys	
195 200 205	

gac ggt atc ttt tca cgt ttc aga aag gaa ttg cac cca gac cat gtt Asp Gly Ile Phe Ser Arg Phe Arg Lys Glu Leu His Pro Asp His Val 210 215 220	672
cca act gtc ggt tct tcg ttt gtc ggt atg tct ttg ttc aat gct aag Pro Thr Val Gly Ser Ser Phe Val Gly Met Ser Leu Phe Asn Ala Lys 225 230 235 240	720
aat cct gct cct atg cac ggt cac gtt att ctt ggt agt gat cat atg Asn Pro Ala Pro Met His Gly His Val Ile Leu Gly Ser Asp His Met 245 250 255	768
cca atc ttg gtt tac caa atc agt cca gaa gaa aca aga atc ctt tgt Pro Ile Leu Val Tyr Gln Ile Ser Pro Glu Glu Thr Arg Ile Leu Cys 260 265 270	816
gct tac aac tct cca aag gtc cca gct gat atc aag agt tgg atg att Ala Tyr Asn Ser Pro Lys Val Pro Ala Asp Ile Lys Ser Trp Met Ile 275 280 285	864
aag gat gtc caa cct ttc att cca aag agt cta cgt cct tca ttt gat Lys Asp Val Gln Pro Phe Ile Pro Lys Ser Leu Arg Pro Ser Phe Asp 290 295 300	912
gaa gcc gtc agc caa ggt aaa ttt aga gct atg cca aac tcc tac ttg Glu Ala Val Ser Gln Gly Lys Phe Arg Ala Met Pro Asn Ser Tyr Leu 305 310 315 320	960
cca gct aga caa aac gac gtc act ggt atg tgt gtt atc ggt gac gct Pro Ala Arg Gln Asn Asp Val Thr Gly Met Cys Val Ile Gly Asp Ala 325 330 335	1008
cta aat atg aga cat cca ttg act ggt ggt ggt atg act gtc ggt ttg Leu Asn Met Arg His Pro Leu Thr Gly Gly Gly Met Thr Val Gly Leu 340 345 350	1056
cat gat gtt gtc ttg ttg att aag aaa ata ggt gac cta gac ttc agc His Asp Val Val Leu Leu Ile Lys Lys Ile Gly Asp Leu Asp Phe Ser 355 360 365	1104
gac cgt gaa aag gtt ttg gat gaa tta cta gac tac cat ttc gaa aga Asp Arg Glu Lys Val Leu Asp Glu Leu Leu Asp Tyr His Phe Glu Arg 370 375 380	1152
aag agt tac gat tcc gtt att aac gtt ttg tca gtg gct ttg tat tct Lys Ser Tyr Asp Ser Val Ile Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Tyr Ser 385 390 395 400	1200

23

ttg ttc gct gct gac agc gat aac ttg aag gca tta caa aaa ggt tgt 1248
 Leu Phe Ala Ala Asp Ser Asp Asn Leu Lys Ala Leu Gln Lys Gly Cys
 405 410 415

ttc aaa tat ttc caa aga ggt ggc gat tgt gtc aac aaa ccc gtt gaa 1296
 Phe Lys Tyr Phe Gln Arg Gly Gly Asp Cys Val Asn Lys Pro Val Glu
 420 425 430

ttt ctg tct ggt gtc ttg cca aag cct ttg caa ttg acc agg gtt ttc 1344
 Phe Leu Ser Gly Val Leu Pro Lys Pro Leu Gln Leu Thr Arg Val Phe
 435 440 445

ttc gct gtc gct ttt tac acc att tac ttg aac atg gaa gaa cgt ggt 1392
 Phe Ala Val Ala Phe Tyr Thr Ile Tyr Leu Asn Met Glu Glu Arg Gly
 450 455 460

ttc ttg gga tta cca atg gct tta ttg gaa ggt att atg att ttg atc 1440
 Phe Leu Gly Leu Pro Met Ala Leu Leu Glu Gly Ile Met Ile Leu Ile
 465 470 475 480

aca gct att aga gta ttc acc cca ttt ttg ttt ggt gag ttg att ggt 1488
 Thr Ala Ile Arg Val Phe Thr Pro Phe Leu Phe Gly Glu Leu Ile Gly
 485 490 495

taa 1491

<210> 8

<211> 496

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 8

Met Ser Ala Val Asn Val Ala Pro Glu Leu Ile Asn Ala Asp Asn Thr
 1 5 10 15

Ile Thr Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ala Gly Val Ile Gly Pro Cys
 20 25 30

24

Val Ala Thr Gly Leu Ala Arg Lys Gly Lys Lys Val Leu Ile Val Glu
35 40 45

Arg Asp Trp Ala Met Pro Asp Arg Ile Val Gly Glu Leu Met Gln Pro
50 55 60

Gly Gly Val Arg Ala Leu Arg Ser Leu Gly Met Ile Gln Ser Ile Asn
65 70 75 80

Asn Ile Glu Ala Tyr Pro Val Thr Gly Tyr Thr Val Phe Phe Asn Gly
85 90 95

Glu Gln Val Asp Ile Pro Tyr Pro Tyr Lys Ala Asp Ile Pro Lys Val
100 105 110

Glu Lys Leu Lys Asp Leu Val Lys Asp Gly Asn Asp Lys Val Leu Glu
115 120 125

Asp Ser Thr Ile His Ile Lys Asp Tyr Glu Asp Asp Glu Arg Glu Arg
130 135 140

Gly Val Ala Phe Val His Gly Arg Phe Leu Asn Asn Leu Arg Asn Ile
145 150 155 160

Thr Ala Gln Glu Pro Asn Val Thr Arg Val Gln Gly Asn Cys Ile Glu
165 170 175

Ile Leu Lys Asp Glu Lys Asn Glu Val Val Gly Ala Lys Val Asp Ile
180 185 190

Asp Gly Arg Gly Lys Val Glu Phe Lys Ala His Leu Thr Phe Ile Cys
195 200 205

Asp Gly Ile Phe Ser Arg Phe Arg Lys Glu Leu His Pro Asp His Val
210 215 220

25

Pro Thr Val Gly Ser Ser Phe Val Gly Met Ser Leu Phe Asn Ala Lys
225 230 235 240

Asn Pro Ala Pro Met His Gly His Val Ile Leu Gly Ser Asp His Met
245 250 255

Pro Ile Leu Val Tyr Gln Ile Ser Pro Glu Glu Thr Arg Ile Leu Cys
260 265 270

Ala Tyr Asn Ser Pro Lys Val Pro Ala Asp Ile Lys Ser Trp Met Ile
275 280 285

Lys Asp Val Gln Pro Phe Ile Pro Lys Ser Leu Arg Pro Ser Phe Asp
290 295 300

Glu Ala Val Ser Gln Gly Lys Phe Arg Ala Met Pro Asn Ser Tyr Leu
305 310 315 320

Pro Ala Arg Gln Asn Asp Val Thr Gly Met Cys Val Ile Gly Asp Ala
325 330 335

Leu Asn Met Arg His Pro Leu Thr Gly Gly Gly Met Thr Val Gly Leu
340 345 350

His Asp Val Val Leu Leu Ile Lys Lys Ile Gly Asp Leu Asp Phe Ser
355 360 365

Asp Arg Glu Lys Val Leu Asp Glu Leu Leu Asp Tyr His Phe Glu Arg
370 375 380

Lys Ser Tyr Asp Ser Val Ile Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Leu Phe Ala Ala Asp Ser Asp Asn Leu Lys Ala Leu Gln Lys Gly Cys
405 410 415

26

Phe Lys Tyr Phe Gln Arg Gly Gly Asp Cys Val Asn Lys Pro Val Glu
 420 425 430

Phe Leu Ser Gly Val Leu Pro Lys Pro Leu Gln Leu Thr Arg Val Phe
 435 440 445

Phe Ala Val Ala Phe Tyr Thr Ile Tyr Leu Asn Met Glu Glu Arg Gly
 450 455 460

Phe Leu Gly Leu Pro Met Ala Leu Leu Glu Gly Ile Met Ile Leu Ile
 465 470 475 480

Thr Ala Ile Arg Val Phe Thr Pro Phe Leu Phe Gly Glu Leu Ile Gly
 485 490 495

<210> 9

<211> 1335

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1335)

<223>

<400> 9

atg gga aag cta tta caa ttg gca ttg cat ccg gtc gag atg aag gca	48
Met Gly Lys Leu Leu Gln Leu Ala Leu His Pro Val Glu Met Lys Ala	
1 5 10 15	
gct ttg aag ctg aag ttt tgc aga aca ccg cta ttc tcc atc tat gat	96
Ala Leu Lys Leu Lys Phe Cys Arg Thr Pro Leu Phe Ser Ile Tyr Asp	
20 25 30	

cag tcc acg tct cca tat ctc ttg cac tgt ttc gaa ctg ttg aac ttg	144
Gln Ser Thr Ser Pro Tyr Leu Leu His Cys Phe Glu Leu Leu Asn Leu	
35 40 45	
acc tcc aga tcg ttt gct gct gtg atc aga gag ctg cat cca gaa ttg	192
Thr Ser Arg Ser Phe Ala Ala Val Ile Arg Glu Leu His Pro Glu Leu	
50 55 60	
aga aac tgt gtt act ctc ttt tat ttg att tta agg gct ttg gat acc	240
Arg Asn Cys Val Thr Leu Phe Tyr Leu Ile Leu Arg Ala Leu Asp Thr	
65 70 75 80	
atc gaa gac gat atg tcc atc gaa cac gat ttg aaa att gac ttg ttg	288
Ile Glu Asp Asp Met Ser Ile Glu His Asp Leu Lys Ile Asp Leu Leu	
85 90 95	
cgt cac ttc cac gag aaa ttg ttg tta act aaa tgg agt ttc gac gga	336
Arg His Phe His Glu Lys Leu Leu Leu Thr Lys Trp Ser Phe Asp Gly	
100 105 110	
aat gcc ccc gat gtg aag gac aga gcc gtt ttg aca gat ttc gaa tcg	384
Asn Ala Pro Asp Val Lys Asp Arg Ala Val Leu Thr Asp Phe Glu Ser	
115 120 125	
att ctt att gaa ttc cac aaa ttg aaa cca gaa tat caa gaa gtc atc	432
Ile Leu Ile Glu Phe His Lys Leu Lys Pro Glu Tyr Gln Glu Val Ile	
130 135 140	
aag gag atc acc gag aaa atg ggt aat ggt atg gcc gac tac atc tta	480
Lys Glu Ile Thr Glu Lys Met Gly Asn Gly Met Ala Asp Tyr Ile Leu	
145 150 155 160	
gat gaa aat tac aac ttg aat ggg ttg caa acc gtc cac gac tac gac	528
Asp Glu Asn Tyr Asn Leu Asn Gly Leu Gln Thr Val His Asp Tyr Asp	
165 170 175	
gtg tac tgt cac tac gta gct ggt ttg gtc ggt gat ggt ttg acc cgt	576
Val Tyr Cys His Tyr Val Ala Gly Leu Val Gly Asp Gly Leu Thr Arg	
180 185 190	
ttg att gtc att gcc aag ttt gcc aac gaa tct ttg tat tct aat gag	624
Leu Ile Val Ile Ala Lys Phe Ala Asn Glu Ser Leu Tyr Ser Asn Glu	
195 200 205	
caa ttg tat gaa agc atg ggt ctt ttc cta caa aaa acc aac atc atc	672
Gln Leu Tyr Glu Ser Met Gly Leu Phe Leu Gln Lys Thr Asn Ile Ile	
210 215 220	

aga	gat	tac	aat	gaa	gat	ttg	gtc	gat	ggg	aga	tcc	ttc	tgg	ccc	aag	720
Arg	Asp	Tyr	Asn	Glu	Asp	Leu	Val	Asp	Gly	Arg	Ser	Phe	Trp	Pro	Lys	
225					230					235					240	
gaa	atc	tgg	tca	caa	tac	gct	cct	cag	ttg	aag	gac	ttc	atg	aaa	cct	768
Glu	Ile	Trp	Ser	Gln	Tyr	Ala	Pro	Gln	Leu	Lys	Asp	Phe	Met	Lys	Pro	
				245					250					255		
gaa	aac	gaa	caa	ctg	ggg	ttg	gac	tgt	ata	aac	cac	ctc	gtc	tta	aac	816
Glu	Asn	Glu	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp	Cys	Ile	Asn	His	Leu	Val	Leu	Asn	
			260					265					270			
gca	ttg	agt	cat	gtt	atc	gat	gtg	ttg	act	tat	ttg	gcc	ggg	atc	cac	864
Ala	Leu	Ser	His	Val	Ile	Asp	Val	Leu	Thr	Tyr	Leu	Ala	Gly	Ile	His	
		275					280					285				
gag	caa	tcc	act	ttc	caa	ttt	tgt	gcc	att	ccc	caa	gtt	atg	gcc	att	912
Glu	Gln	Ser	Thr	Phe	Gln	Phe	Cys	Ala	Ile	Pro	Gln	Val	Met	Ala	Ile	
	290					295				300						
gca	acc	ttg	gct	ttg	gta	ttc	aac	aac	cgt	gaa	gtg	cta	cat	ggc	aat	960
Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Phe	Asn	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	His	Gly	Asn	
305					310					315					320	
gta	aag	att	cgt	aag	ggg	act	acc	tgc	tat	tta	att	ttg	aaa	tca	agg	1008
Val	Lys	Ile	Arg	Lys	Gly	Thr	Thr	Cys	Tyr	Leu	Ile	Leu	Lys	Ser	Arg	
				325					330					335		
act	ttg	cgt	ggc	tgt	gtc	gag	att	ttt	gac	tat	tac	tta	cgt	gat	atc	1056
Thr	Leu	Arg	Gly	Cys	Val	Glu	Ile	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Asp	Ile	
			340					345					350			
aaa	tct	aaa	ttg	gct	gtg	caa	gat	cca	aat	ttc	tta	aaa	ttg	aac	att	1104
Lys	Ser	Lys	Leu	Ala	Val	Gln	Asp	Pro	Asn	Phe	Leu	Lys	Leu	Asn	Ile	
		355					360					365				
caa	atc	tcc	aag	atc	gaa	cag	ttt	atg	gaa	gaa	atg	tac	cag	gat	aaa	1152
Gln	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu	Gln	Phe	Met	Glu	Glu	Met	Tyr	Gln	Asp	Lys	
	370					375					380					
tta	cct	cct	aac	gtg	aag	cca	aat	gaa	act	cca	att	ttc	ttg	aaa	gtt	1200
Leu	Pro	Pro	Asn	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Pro	Ile	Phe	Leu	Lys	Val	
385					390					395					400	
aaa	gaa	aga	tcc	aga	tac	gat	gat	gaa	ttg	gtt	cca	acc	caa	caa	gaa	1248
Lys	Glu	Arg	Ser	Arg	Tyr	Asp	Asp	Glu	Leu	Val	Pro	Thr	Gln	Gln	Glu	
				405					410				415			

29

gaa gag tac aag ttc aat atg gtt tta tct atc atc ttg tcc gtt ctt 1296
 Glu Glu Tyr Lys Phe Asn Met Val Leu Ser Ile Ile Leu Ser Val Leu
 420 425 430

ctt ggg ttt tat tat ata tac act tta cac aga gcg tga 1335
 Leu Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Thr Leu His Arg Ala
 435 440

<210> 10

<211> 444

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 10

Met Gly Lys Leu Leu Gln Leu Ala Leu His Pro Val Glu Met Lys Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Leu Lys Phe Cys Arg Thr Pro Leu Phe Ser Ile Tyr Asp
 20 25 30

Gln Ser Thr Ser Pro Tyr Leu Leu His Cys Phe Glu Leu Leu Asn Leu
 35 40 45

Thr Ser Arg Ser Phe Ala Ala Val Ile Arg Glu Leu His Pro Glu Leu
 50 55 60

Arg Asn Cys Val Thr Leu Phe Tyr Leu Ile Leu Arg Ala Leu Asp Thr
 65 70 75 80

Ile Glu Asp Asp Met Ser Ile Glu His Asp Leu Lys Ile Asp Leu Leu
 85 90 95

Arg His Phe His Glu Lys Leu Leu Leu Thr Lys Trp Ser Phe Asp Gly
 100 105 110

Asn Ala Pro Asp Val Lys Asp Arg Ala Val Leu Thr Asp Phe Glu Ser
115 120 125

Ile Leu Ile Glu Phe His Lys Leu Lys Pro Glu Tyr Gln Glu Val Ile
130 135 140

Lys Glu Ile Thr Glu Lys Met Gly Asn Gly Met Ala Asp Tyr Ile Leu
145 150 155 160

Asp Glu Asn Tyr Asn Leu Asn Gly Leu Gln Thr Val His Asp Tyr Asp
165 170 175

Val Tyr Cys His Tyr Val Ala Gly Leu Val Gly Asp Gly Leu Thr Arg
180 185 190

Leu Ile Val Ile Ala Lys Phe Ala Asn Glu Ser Leu Tyr Ser Asn Glu
195 200 205

Gln Leu Tyr Glu Ser Met Gly Leu Phe Leu Gln Lys Thr Asn Ile Ile
210 215 220

Arg Asp Tyr Asn Glu Asp Leu Val Asp Gly Arg Ser Phe Trp Pro Lys
225 230 235 240

Glu Ile Trp Ser Gln Tyr Ala Pro Gln Leu Lys Asp Phe Met Lys Pro
245 250 255

Glu Asn Glu Gln Leu Gly Leu Asp Cys Ile Asn His Leu Val Leu Asn
260 265 270

Ala Leu Ser His Val Ile Asp Val Leu Thr Tyr Leu Ala Gly Ile His
275 280 285

Glu Gln Ser Thr Phe Gln Phe Cys Ala Ile Pro Gln Val Met Ala Ile
290 295 300

Ala Thr Leu Ala Leu Val Phe Asn Asn Arg Glu Val Leu His Gly Asn
305 310 315 320

Val Lys Ile Arg Lys Gly Thr Thr Cys Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Arg
325 330 335

Thr Leu Arg Gly Cys Val Glu Ile Phe Asp Tyr Tyr Leu Arg Asp Ile
340 345 350

Lys Ser Lys Leu Ala Val Gln Asp Pro Asn Phe Leu Lys Leu Asn Ile
355 360 365

Gln Ile Ser Lys Ile Glu Gln Phe Met Glu Glu Met Tyr Gln Asp Lys
370 375 380

Leu Pro Pro Asn Val Lys Pro Asn Glu Thr Pro Ile Phe Leu Lys Val
385 390 395 400

Lys Glu Arg Ser Arg Tyr Asp Asp Glu Leu Val Pro Thr Gln Gln Glu
405 410 415

Glu Glu Tyr Lys Phe Asn Met Val Leu Ser Ile Ile Leu Ser Val Leu
420 425 430

Leu Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Thr Leu His Arg Ala
435 440

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

32

<220>

<221> Primer

<222> (1) .. (35)

<223> AtHT-5'

<400> 11

ctgcggccgc atcatggacc aattggtgaa aactg

35

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1) .. (32)

<223> AtHT-3'

<400> 12

aactcgagag acacatggtg ctgttggtgc tc

32

<210> 13

<211> 60

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1) .. (60)

<223> ERG5-Crelox-5'

<400> 13

atgagttctg tcgcagaaaa tataatacaa catgccactc ccagctgaag cttcgtacgc 60

<210> 14

<211> 62

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1) .. (62)

<223> ERG5-Crelox-3'

<400> 14

ttattcgaag acttctccag taattgggtc tctctttttg gcataggcca ctagtggatc 60

tg

62

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/002582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/52 C12N15/81 C12N9/02 C12P33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 486 290 A (AMOCO CORP) 20 May 1992 (1992-05-20) the whole document	1-30
Y	DE 197 44 212 A (SCHERING AG) 15 April 1999 (1999-04-15) the whole document	1-30
Y	WO 02/061072 A (KARUNANANDAA BALASULOJINI ;MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US); POST-BEIT) 8 August 2002 (2002-08-08) das ganze Dokument, vor allem Anspruch 1	1-30
P,X	WO 03/064650 A (BASF AG ;VEEN MARKUS (DE); LANG CHRISTINE (DE)) 7 August 2003 (2003-08-07) the whole document	1-30

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 2004

Date of mailing of the international search report

06/07/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lüdemann, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/002582

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0486290	A	20-05-1992	US 5460949 A	24-10-1995
			DE 69133012 D1	27-06-2002
			DE 69133012 T2	02-01-2003
			DK 486290 T3	16-09-2002
			EP 0486290 A2	20-05-1992
			ES 2176177 T3	01-12-2002
			JP 3283551 B2	20-05-2002
			JP 5192184 A	03-08-1993
DE 19744212	A	15-04-1999	DE 19744212 A1	15-04-1999
			AU 750768 B2	25-07-2002
			AU 1147499 A	23-04-1999
			CA 2305780 A1	08-04-1999
			WO 9916886 A1	08-04-1999
			EP 1015597 A1	05-07-2000
			HU 0003751 A2	28-02-2001
			JP 2001518301 T	16-10-2001
			NO 20001625 A	29-03-2000
			SK 4382000 A3	12-09-2000
WO 02061072	A	08-08-2002	US 2003150008 A1	07-08-2003
			CA 2433532 A1	08-08-2002
			EP 1381267 A2	21-01-2004
			WO 02061072 A2	08-08-2002
WO 03064650	A	07-08-2003	DE 10203352 A1	31-07-2003
			WO 03064650 A1	07-08-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002582

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/52 C12N15/81 C12N9/02 C12P33/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 486 290 A (AMOCO CORP) 20. Mai 1992 (1992-05-20) das ganze Dokument	1-30
Y	DE 197 44 212 A (SCHERING AG) 15. April 1999 (1999-04-15) das ganze Dokument	1-30
Y	WO 02/061072 A (KARUNANANDAA BALASULOJINI; MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US); POST-BEIT) 8. August 2002 (2002-08-08) das ganze Dokument, vor allem Anspruch 1	1-30
P, X	WO 03/064650 A (BASF AG ; VEEN MARKUS (DE); LANG CHRISTINE (DE)) 7. August 2003 (2003-08-07) das ganze Dokument	1-30



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Juni 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/07/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lüdemann, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002582

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0486290	A	20-05-1992	US 5460949 A	24-10-1995
			DE 69133012 D1	27-06-2002
			DE 69133012 T2	02-01-2003
			DK 486290 T3	16-09-2002
			EP 0486290 A2	20-05-1992
			ES 2176177 T3	01-12-2002
			JP 3283551 B2	20-05-2002
			JP 5192184 A	03-08-1993
DE 19744212	A	15-04-1999	DE 19744212 A1	15-04-1999
			AU 750768 B2	25-07-2002
			AU 1147499 A	23-04-1999
			CA 2305780 A1	08-04-1999
			WO 9916886 A1	08-04-1999
			EP 1015597 A1	05-07-2000
			HU 0003751 A2	28-02-2001
			JP 2001518301 T	16-10-2001
			NO 20001625 A	29-03-2000
			SK 4382000 A3	12-09-2000
WO 02061072	A	08-08-2002	US 2003150008 A1	07-08-2003
			CA 2433532 A1	08-08-2002
			EP 1381267 A2	21-01-2004
			WO 02061072 A2	08-08-2002
WO 03064650	A	07-08-2003	DE 10203352 A1	31-07-2003
			WO 03064650 A1	07-08-2003